

## Apparatus and method for determining functions of cells.

**Patent number:** DE68919256T

**Publication date:** 1995-03-16

**Inventor:** IKEDA YASUO (JP); SAKAI KIYOTAKA (JP); ITAGAKI ICHIRO (JP); MIKAMI MASATO (JP); NAGAOKA SHOJI (JP)

**Applicant:** TORAY INDUSTRIES (JP)

**Classification:**

- **international:** G01N33/48; G01N11/14; G01N15/02

- **europaean:**

**Application number:** DE19896019256T 19890406

**Priority number(s):** JP19880087546 19880408

**Also published as:**



EP0337300 (A)

US4936674 (A)

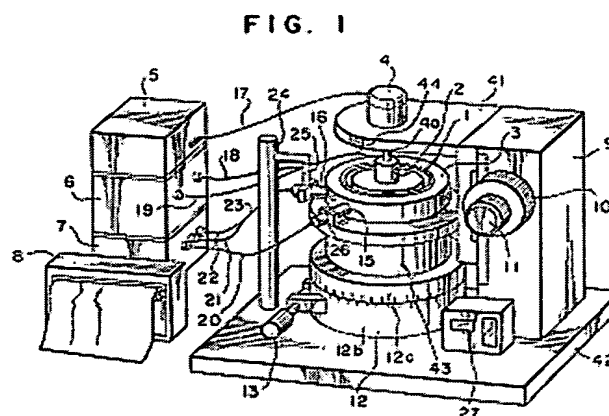
EP0337300 (A)

EP0337300 (B)

Abstract not available for DE68919256T

Abstract of correspondent: **EP0337300**

An apparatus for determining the functioning properties of cells which includes a sample containing chamber (101), a rotor (2) disposed in the chamber (101) and having a conical surface (2a) which faces the inner bottom surface (36a) of the chamber (101) at an angle of not greater than 2 DEG, a ray transmission path (28) from which a ray is projected into a sample of a cell suspension between the rotor (2) and the inner bottom surface (36a), and a transmitted ray detection path (29) from which transmittance from the sample is detected. The optical path length in the sample is not smaller than 1 cm. An adequate shear stress is applied to the sample by adjusting the gap between the rotor (2) and the inner bottom surface (36a) and rotating the rotor (2). A fine response by the cells caused by the applied shear stress, particularly the aggregation of platelets in a platelet suspension, can be accurately and quantitatively determined with a high sensitivity.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①⑨ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENTAMT**

①⑫ **Übersetzung der  
europäischen Patentschrift**

⑥⑦ **EP 0 337 300 B1**

⑩ **DE 689 19 256 T 2**

⑤① Int. Cl.<sup>6</sup>:  
**G 01 N 33/48**  
G 01 N 11/14  
G 01 N 15/02

②①	Deutsches Aktenzeichen:	689 19 256.8
③⑥	Europäisches Aktenzeichen:	89 106 075.8
③⑥	Europäischer Anmeldetag:	6. 4. 89
③⑦	Erstveröffentlichung durch das EPA:	18. 10. 89
③⑦	Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA:	9. 11. 94
④⑦	Veröffentlichungstag im Patentblatt:	16. 3. 95

**DE 689 19 256 T 2**

③⑩ Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
08.04.88 JP 87546/88

⑦③ Patentinhaber:  
Toray Industries, Inc., Tokio/Tokyo, JP

⑦④ Vertreter:  
Kador, U., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 80469  
München

⑧④ Benannte Vertragsstaaten:  
CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

⑦② Erfinder:  
Ikeda, Yasuo, Tokyo, JP; Sakai, Kiyotaka, Tokyo, JP;  
Itagaki, Ichiro, Kamakura-shi Kanagawa-ken, JP;  
Mikami, Masato, Kamakura-shi Kanagawa-ken, JP;  
Nagaoka, Shoji, Kamakura-shi Kanagawa-ken, JP

⑤④ Verfahren und Vorrichtung zur Ermittlung von Zelleigenschaften.

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patentamt inhaltlich nicht geprüft.

**DE 689 19 256 T 2**

1

EP 89 106 075.8

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren, bei dem auf in einer Blutplättchensuspension enthaltene Blutplättchen eine Scherspannung angewendet wird, und das feine Verklumpen der Blutplättchen und die Freisetzungsreaktion der Blutplättchen aufgrund der angewendeten Scherspannung kontinuierlich mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden. Die vorliegende Erfindung kann in großem Umfang zur Diagnose und Behandlung von angeborenen Krankheiten, z.B. Thrombastenie und der von Willebrand-Krankheit und zur Behandlung von erworbenen Krankheiten verwendet werden, z.B. Herzinfarkt, Thrombose und Arteriosklerose, die eine anormale Funktion der Blutplättchen hervorrufen. Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann außerdem zur Entwicklung von Medikamenten verwendet werden, die der Behandlung von Anomalien der Blutplättchen dienen.

Es wurden verschiedene Geräte entwickelt, die die Funktionseigenschaften von Zellen bestimmen, wobei eine Zellsuspension verwendet wird. Insbesondere sind das Gerät, das von Born und O'Brien (Born, G.V.R.: Nature, S. 194, 927 (1962), und O'Brien, J.R.: J. Clin. Path. S. 15, 446 (1962)) und das Gerät, das von Salzman entwickelt wurde (Salzman, E.W.: J. Lab. Clin. Med., S. 62, 724 (1963)) als Geräte bekannt, die die Funktionseigenschaften von Blutplättchen bestimmen können, und diese Geräte werden im großem Umfang bei klinischen Untersuchungen verwendet.

Das erstgenannte Gerät (hier als erste herkömmliche Vorrichtung bezeichnet) wird zur Prüfung der Aggregationseigenschaften der Blutplättchen verwendet. Diese Vorrichtung umfaßt eine Einheit, die einen zylindrischen Glasbehälter mit einem Durchmesser von etwa 5 mm zum Messen der Transparenz der Blutplättchensuspension und ein Aufzeichnungsgerät umfaßt, das den gemessenen Transmissionsfaktor in ein

## 2

entsprechendes elektrisches Signal umwandelt und die Aggregationskurve mit einem Stift aufzeichnet. Bei dieser Vorrichtung wird die Blutplättchensuspension mit 0,2 - 0,3 ml, die durch einen Zentrifugenabscheider vom Blut getrennt wurde, in einem zylindrischen Glasbehälter aufgenommen, und es wird ein Mittel zur Aggregation zugesetzt, z.B. Adenosindiphosphat, Collagen, Epinephrin, Ristocetin oder Thrombin. Wenn die Blutplättchensuspension von einem vorher im Behälter angeordneten Magnetrührer gerührt wird, bilden die Blutplättchen schnell Flocken, und der gemessene Transmissionsfaktor der Blutplättchensuspension steigt an. Die Änderung dieses Transmissionsfaktors kann kontinuierlich als Aggregationskurve der Blutplättchen aufgezeichnet werden.

Das letztgenannte Gerät (hier als zweite herkömmliche Vorrichtung bezeichnet) wird zur Prüfung der Haftungseigenschaften der Blutplättchen verwendet. Diese Vorrichtung nutzt die Eigenschaften der Blutplättchen aus, daß sie an einer Glasoberfläche haften. In dieser Vorrichtung wird das Blut durch ein mit Glaskügelchen gefülltes Rohr geleitet, und die Änderung der Anzahl der Blutplättchen vor dem Durchgang wird im Vergleich mit der nach dem Durchgang gemessen. Diese Vorrichtung umfaßt ein Rohr mit einem Innendurchmesser von etwa 2 mm und einer Länge von etwa 15 cm, das mit Glaskügelchen mit einem Durchmesser von 0,3 - 0,4 mm gefüllt ist, und ein leeres Rohr zur Aufnahme der Blutprobe. Die entsprechenden Enden der beiden Rohre sind durch einen Dreiwegehahn miteinander verbunden, der eine Nadel zur Entnahme des Blutes aufweist. Mit den entsprechenden nicht verbundenen Enden beider Rohre sind Spritzen aus Kunststoff verbunden. Mit den beiden Spritzen ist außerdem ein Aspirator verbunden, und das Blut wird mit konstanter Geschwindigkeit aufgenommen.

Eine akademische Veröffentlichung berichtet über die Veränderung der Eigenschaften der Blutplättchen, die hervorgeru-

## 3

fen wird, wenn eine Scherspannung von etwa  $1 \text{ dyne/cm}^2$  auf eine Blutplättchensuspension angewendet wird, und diese wird kontinuierlich aufgezeichnet (Klose, H.J., Rieger, H. und Schid-Schonbein, H.: Thrombosis Res., S. 7, 261 (1975)). In diesem Bericht wird ein Versuchsgerät beschrieben (hier als dritte herkömmliche Vorrichtung bezeichnet). Diese Vorrichtung umfaßt eine durchlässige konkave Wanne und einen Rotor mit einer konischen Oberfläche, die in einem Winkel von  $3^\circ$  zur unteren Innenoberfläche der Wanne zeigt, und einen Durchmesser von 5 cm hat. Auf der seitlichen Außenoberfläche der Wanne sind zwei optische Fasern vorgesehen, damit zwischen dem Rotor und der unteren Innenoberfläche der Wanne durch eine der optischen Fasern ein Strahl in der Strömungsrichtung der Blutplättchensuspension in die Blutplättchensuspension geleitet und der hindurchgegangene Strahl von der Innenseite der Wanne durch die zweite optische Faser erfaßt wird. Mit dem Ende der optischen Faser, das zum Senden des Strahls verwendet wird, ist eine mit einer Halogenlampe stabilisierte Lichtquelle verbunden, und mit dem Ende der optischen Faser, das zum Erfassen des hindurchgegangenen Strahls verwendet wird, ist ein mit einem Rekorder verbundener Photodetektor verbunden.

Eine Vorrichtung, die gegenüber der dritten herkömmlichen Vorrichtung verbessert ist (die hier als vierte herkömmliche Vorrichtung bezeichnet wird) wird ebenfalls beschrieben (Rieger, H., Baier, H., Schroder, H., Wurzinger, L., Schid-Schonbein, H. und Blasberg, P.: Thrombosis Res. S. 17, 589 (1980)). Diese vierte herkömmliche Vorrichtung weist eine Struktur auf, die dem Rotationsviskosimeter vom Doppelzylindertyp ähnlich ist, sie umfaßt einen Innenzylinder mit einer Lichtquelle und einen Außenzylinder, der drehbar um den Innenzylinder vorgesehen ist. Obwohl das Rotationsviskosimeter vom Doppelzylindertyp im allgemeinen den Nachteil hat, daß durch den Taylor-Wirbel leicht eine sekundäre Strömung auftritt, wird dieser Nachteil bei der vierten herkömmlichen

## 4

Vorrichtung durch die Rotation des Außenzylinders überwunden.

Außerdem wird eine Vorrichtung beschrieben, die der dritten herkömmlichen Vorrichtung ähnlich ist (hier als fünfte herkömmliche Vorrichtung bezeichnet) (Frojmovic, M.M.: Biorheology, S. 12, 193 (1975)). Bei dieser Vorrichtung wird der Lichtweg in einer Blutplättchensuspension bis zu etwa 1 mm verringert, indem eine Lichtquelle und ein Photodetektor in der Richtung angeordnet werden, die zur Strömungsrichtung der Blutplättchensuspension senkrecht ist.

Bei der ersten herkömmlichen Vorrichtung, bei der die Funktionen der Blutplättchen durch die Aggregationskurve bestimmt werden, die durch den Zusatz der Mittel zur Aggregation zur Blutplättchensuspension erhalten wird, besteht das Problem, daß der den Blutplättchen zugesetzte Stimulus nicht physiologisch ist. Bei der klinischen Prüfung mit dieser Vorrichtung wird z.B. die Konzentration von Adenosindiphosphat in der Blutplättchensuspension üblicherweise auf 2 bis 10  $\mu\text{mol}$  geregelt, es ist jedoch überhaupt nicht bekannt, ob Adenosindiphosphat in dieser hohen Konzentration die Aggregation der Blutplättchen im Organismus hervorruft oder nicht. Ristocetin, das eines der Mittel zur Aggregation darstellt, ist außerdem im Organismus nicht vorhanden. Trotz der Tatsache, daß viele Forscher berichten, daß Blutplättchen durch den Einfluß der Blutströmung aktiviert werden, wird der den Strömungszustand des Blutes darstellende Faktor außerdem nur durch die Rotationsgeschwindigkeit des Rührers definiert, diese ist im allgemeinen nicht gleichmäßig und kann nicht exakt bestimmt werden. Da der Lichtweg in der Blutplättchensuspension außerdem nur etwa 5 mm beträgt, kann die Änderung des Wertes des hindurchgegangenen Strahls aufgrund der feinen Aggregation der Blutplättchen als Folge des feinen Stimulus im Organismus nicht nachgewiesen werden. Da die erste herkömmliche Vorrichtung die oben genannte Pro-

## 5

bleme aufweist, identifizieren die mit dieser Vorrichtung erhaltenen Ergebnisse folglich klinische Symptome oftmals nicht, obwohl diese Vorrichtung bei klinischen Untersuchungen in großem Umfang angewendet wird.

Bei der zweiten herkömmlichen Vorrichtung, bei der die Haftungseigenschaften der Blutplättchen beim Anheften an eine Glasoberfläche ausgenutzt werden, gibt es ähnliche Probleme wie bei der ersten herkömmlichen Vorrichtung, da das nicht-physiologische Phänomen der Haftung an einer Glasoberfläche auftritt. Da bei dieser Vorrichtung die Probe zwischen Glaskügelchen strömt, weicht außerdem der Strömungszustand, der die Haftungseigenschaften der Blutplättchen stark beeinflusst, vom Strömungszustand in einem Organismus stark. Die durch diese Vorrichtung erhaltenen Ergebnisse repräsentieren folglich die wirklichen Eigenschaften der Blutplättchen nicht exakt.

Die gemeinsamen Eigenschaften der dritten, vierten und fünften herkömmlichen Vorrichtungen liegen außerdem darin, daß der Strömungszustand der Blutplättchensuspension durch die Scherspannung bestimmt werden kann, die einen generellen Faktor darstellt. Da die Reaktionen der Blutplättchen bei Erkrankungen, z.B. Herzinfarkt, Thrombose und Arteriosclerose, eine wichtige Rolle spielen, gab es jahrelang umfangreiche Forschungen und viele Diskussionen, dies wird in vielen wissenschaftlichen und akademischen Gerichten und Dokumenten aufgeführt; wobei diese und andere Vorrichtungen verwendet wurden, die den Strömungszustand der Blutplättchensuspension bestimmen können. Trotzdem können im Vergleich mit der ersten und der zweiten herkömmlichen Vorrichtung die dritte, vierte und fünfte herkömmliche Vorrichtung noch nicht für klinische Untersuchungen angewendet werden. Der Grund dafür liegt darin, daß die dritte, vierte und fünfte herkömmliche Vorrichtung folgende Probleme zeigen: Der Mechanismus der Aggregation und die Reaktionseigenschaf-

## 6

ten der Blutplättchen aufgrund der Scherspannung wurde noch nicht aufgeklärt, und der Zusammenhang zwischen der Aggregation und der Reaktion der Blutplättchen und den Erkrankungen wurde noch nicht erkannt.

Erstens zielt die dritte herkömmliche Vorrichtung auf die Messung der Aggregation der Blutplättchen bei Bedingungen einer geringen Scherspannung, z.B. etwa  $1 \text{ dyne/cm}^2$ , und verwendet einen Rotor mit einer konischen Oberfläche, die in einem Winkel von  $3^\circ$  zur unteren Innenoberfläche der Wanne zeigt. Deshalb beträgt die gleichmäßige Scherspannung, die mit dieser Vorrichtung auf die Blutplättchensuspension angewendet werden kann, die eine Viskosität von etwa  $1 \text{ cP}$  hat, höchstens etwa  $5 \text{ dyne/cm}^2$ . Wenn auf die Blutplättchensuspension eine Scherspannung angewendet wird, die einen höheren als den oben genannten Wert hat, wird der Strömungszustand der Suspension turbulent und die angewendete Spannung wird ungleichmäßig. Da Licht mit einer großen Wellenlängenstreuung, das aus der Lichtquelle in Form der Halogenlampe abgegeben wird, in die Blutplättchensuspension gestrahlt wird, ohne daß ein optischer Filter oder ein Spektroskop verwendet wird, wird bei dieser Vorrichtung außerdem der Transmissionsfaktor der Strahlen, die nachgewiesen werden, leicht von der Absorption der Strahlen durch das Protein im Blut und/oder die Streuung der Strahlen durch das Lipid im Blut beeinflusst. Das Verhältnis zwischen der Größe der Partikel und der Lichtstreuung ändert sich außerdem auf komplizierte Weise, dies hängt von der Wellenlänge des Lichtes in einem Dispersionssystem mit großen Partikeln, z.B. einer Blutplättchensuspension, ab. Wenn Licht mit dieser Wellenlängenstreuung direkt in eine Blutplättchensuspension gestrahlt wird, kann folglich die feine Aggregation der Blutplättchen durch die Scherspannung nicht nachgewiesen werden. Die vierte herkömmliche Vorrichtung verbessert diesen Nachteil der dritten herkömmlichen Vorrichtung durch die Verringerung des Lichtweges, indem die Struktur eines Doppelzylinders an-



## 7

gewendet wird. Da der Lichtweg jedoch nahezu der gleiche oder kürzer als der der ersten herkömmlichen Vorrichtung ist, kann eine große Blutplättchenaggregation mit diesem Gerät gemessen werden, die feine Aggregation der Blutplättchen aufgrund des sehr kleinen physiologischen Stimulus kann jedoch nicht gemessen werden.

Der Lichtweg ist bei der fünften herkömmlichen Vorrichtung sehr gering, d.h. etwa 1 mm. Deshalb ist diese Vorrichtung zum Messen geringer Veränderungen der Blutplättchen ziemlich ungeeignet.

Es ist erforderlich, daß eine Vorrichtung und ein Verfahren bereitgestellt werden, die eine genaue Reaktion von Blutplättchen in einer Blutplättchensuspension, d.h. die Aggregation und die Freisetzung von Substanzen, kontinuierlich messen können, wenn auf die Blutplättchensuspension eine Scherspannung angewendet wird, und die zur Diagnose und Behandlung von Krankheiten verwendet werden können, die Veränderungen der Eigenschaften bzw. der Funktionen von Blutplättchen hervorrufen, und die zur Entwicklung von Medikamenten verwendet werden können, die der Behandlung von Anomalien der Blutplättchen dienen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Bestimmung der Aggregationseigenschaften von Blutplättchen, die in einer Probe einer Blutplättchensuspension enthalten sind, umfaßt eine zylindrische Kammer zur Aufnahme der Probe, die hier durch eine untere Innenoberfläche und eine seitliche Innenoberfläche definiert wird, einen Rotor, der in der Kammer zur Aufnahme der Probe angeordnet ist und eine konische Oberfläche aufweist, die in Richtung der unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe konvex ist, einen Strahlenübertragungsweg, der auf der seitlichen Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe vorgesehen ist, der für die Übertragung des Strahls durch die Probe sorgt, die zwischen

## 8

der unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe und der konischen Oberfläche des Rotors angeordnet ist, und einen Erfassungsweg für den übertragenen Strahl, der auf der seitlichen Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe angeordnet ist, der für die Erfassung des Strahls sorgt, der durch die Probe hindurchgegangen ist, die zwischen der unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe und der konischen Oberfläche des Rotors angeordnet ist. Die konische Oberfläche des Rotors zeigt in einem Winkel von nicht mehr als  $2^\circ$  zur unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe. Der Lichtweg in der Probe zwischen dem Strahlenübertragungsweg und dem Erfassungsweg für den übertragenen Strahl ist nicht kürzer als 1 cm.

Die Vorrichtung kann außerdem eine Antriebseinrichtung zur Rotation des Rotors, die mit dem Rotor verbunden ist, eine Regeleinheit zur Steuerung der Antriebseinrichtung, eine Lichtquelle, die wirksam mit dem Strahlenübertragungsweg verbunden ist, um diesem Strahlen zuzuführen, einen Photodetektor, der wirksam mit dem Erfassungsweg für den übertragenen Strahl verbunden ist, um den daraus übertragenen Strahl zu erfassen, und einen Rekorder umfassen, der mit dem Photodetektor verbunden ist, um das vom Photodetektor abgegebene Signal aufzuzeichnen.

Die Kammer zur Aufnahme der Probe kann durch eine zylindrische Wanne definiert werden, die aus einer lichtdurchlässigen Seitenwand und einer Bodenwand aufgebaut ist.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Bestimmung der Aggregations-eigenschaften von Blutplättchen, die in einer Probe einer Blutplättchensuspension enthalten sind, umfaßt die Schritte: Anordnen der Probe in der Kammer zur Aufnahme der Probe, die zylindrisch ist und durch eine untere Innenoberfläche und eine seitliche Innenoberfläche definiert wird, Anwendung einer Scherspannung auf die Probe, die zwischen der unteren

Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe und der konischen Oberfläche des Rotors angeordnet ist, der in der Kammer zur Aufnahme der Probe angeordnet ist, indem dieser Rotor gedreht wird, Aussenden eines Strahls von der seitlichen Innenoberfläche zur Probe, die zwischen der konischen Oberfläche und der unteren Innenoberfläche angeordnet ist, so daß der Lichtweg des abgegebenen Strahls in der Probe bei einer Länge von nicht weniger als 1 cm gehalten wird, Erfassen des von der seitlichen Innenoberfläche durch die Probe übertragenen Strahls, und Bestimmung des Aggregationsgrades der in der Probe enthaltenen Zellen, der durch die Anwendung der Scherspannung hervorgerufen wurde, indem die Abweichung des erfaßten, von der seitlichen Innenoberfläche übertragene Strahls gemessen wird. Die konische Oberfläche des Rotors ist zur unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe konvex und zeigt in einem Winkel von nicht mehr als  $2^\circ$  zur unteren Innenoberfläche.

Die durch die vorliegende Erfindung bestimmten Eigenschaften der Blutplättchen sind die Reaktionen durch Blutplättchen, die direkt oder indirekt durch die angewendete Scherspannung hervorgerufen werden, konkret sind es die Aggregationseigenschaften der Blutplättchen und die Freisetzung von Substanzen aus den Blutplättchen.

In der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird zwischen dem gedrehten Rotor und der unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe in der Probe eine Scherspannung erzeugt. Der Abstand zwischen dem Rotor und der Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe muß so festgelegt werden, daß die Scherspannung, die zwischen der seitlichen Außenoberfläche des Rotors und der seitlichen Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe erzeugt wird, nicht größer sein kann, als die Scherspannung, die zwischen der konischen Oberfläche des Rotors und der unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe erzeugt wird. Wenn der Innendurchmesser

der Kammer zur Aufnahme der Probe zu groß ist, wird auch die in der Kammer aufzunehmende Probenmenge zu hoch, und somit ist ein zu großer Innendurchmesser nicht bevorzugt. Der Innendurchmesser der Kammer zur Aufnahme der Probe wird vorzugsweise so festgelegt, daß der Abstand zwischen der seitlichen Außenoberfläche des Rotors und der seitlichen Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe 0,2 - 2,0 mm betragen kann.

Die Kammer zur Aufnahme der Probe wird vorteilhafterweise durch eine zylindrische Wanne definiert, die eine lichtdurchlässige Seitenwand aufweist und die so aufgebaut ist, daß sie von der Halterung gelöst werden kann, die diese Wanne hält. Da die Wanne von der Halterung gelöst werden kann, läßt sich diese Wanne leicht handhaben, oder die Anordnung der Probe in der Wanne oder das Herausnehmen der Probe aus der Wanne ist einfach. Die Bodenwand der Wanne ist vorzugsweise nicht lichtdurchlässig, da mit diesem Aufbau exaktere Werte erhalten werden können. Wenn diese zylindrische Wand verwendet wird, wird der Abstand zwischen der seitlichen Außenoberfläche des Rotors und der seitlichen Innenoberfläche der Wanne ebenfalls vorzugsweise auf 0,2 - 2,0 mm eingestellt. Es müssen zumindest die Abschnitte der Seitenwand der Wanne lichtdurchlässig sein, die mit dem Strahlenübertragungsweg und dem Erfassungsweg für den übertragenen Strahl in Kontakt stehen. Wenn der übertragene Strahl z.B. im sichtbaren Bereich des Spektrums ist, ist das bevorzugte Material der Seitenwand ein Kunststoffmaterial, z.B. ein kostengünstiges Acrylpolymer oder Polystyrol, und wenn der übertragene Strahl im UV- oder IR-Bereich des Spektrums liegt, ist für dieses Material Quarzglas erwünscht.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist der Radius des Rotors, der der Zellsuspension die Scherspannung verleiht, vorzugsweise nicht größer als 3 cm, noch bevorzugter liegt er im Bereich von 0,7 - 2,0 cm. Die untere Innenoberfläche

## 11

der Kammer zur Aufnahme der Probe erstreckt sich senkrecht zur Rotationsachse des Rotors. Der Winkel zwischen der konischen Oberfläche des Rotors und der unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe ist nicht größer als  $2^\circ$  und liegt vorzugsweise im Bereich von  $0,3 - 1,5^\circ$ .

In dieser Vorrichtung werden im Strahlenübertragungsweg bzw. im Erfassungsweg für den übertragenen Strahl wünschenswerterweise optische Fasern verwendet. Als Material für diese optischen Fasern ist ein kostengünstiger Kunststoff erwünscht, wenn der Strahl im sichtbaren Bereich des Spektrums liegt, und Quarzglas ist erwünscht, wenn der Strahl im UV- oder IR-Bereich des Spektrums liegt.

Die wirksam mit dem Strahlenübertragungsweg verbundene Lichtquelle wird nach den Merkmalen der zu messenden Zellen ausgewählt. Eine Halogenlampe oder eine Wolframlampe, mit der ein Interferenzfilter verbunden ist, oder ein Strahler, der Strahlen mit stark monochromatischen Eigenschaften abgeben kann, z.B. ein Laser, sind als Lichtquelle bevorzugt. Es können zwei oder mehr Arten dieser Lichtquellen gleichzeitig verwendet werden, und die aus diesen Quellen abgegebenen Strahlen können durch die optische Faser im Strahlenübertragungsweg weitergeleitet werden.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung ist ein Detektor als Photodetektor erwünscht, der die photoelektromotorische Kraft ausnutzt, z.B. eine Photodiode. Wenn die nachzuweisende Strahlung eine schwache Strahlung, z.B. eine Fluoreszenzstrahlung ist, wird für den Photodetektor vorzugsweise ein Photoelektronenvervielfacher verwendet. Wenn zwei oder mehr Strahlungsarten emittiert werden, oder wenn zwei oder mehr Arten Fluoreszenzstrahlungen erfaßt werden, ist es erwünscht, daß nur der zu erfassende Strahl oder die zu erfassenden Strahlen übertragen werden, die die gewünschte Wellenlänge haben, wobei optische Filter, z.B. Interferenz-

12

filter verwendet werden, und die entsprechend ausgewählten Strahlen durch die optische Faser zum Photodetektor übertragen werden.

Bei der vorliegenden Erfindung wird der Lichtweg als kürzester Abstand zwischen dem Strahlenübertragungsweg und dem Erfassungsweg für den übertragenen Strahl in der Zellsuspension in der Kammer zur Aufnahme der Probe definiert. Dieser Lichtweg darf nicht kürzer als 1 cm sein. Der Lichtweg liegt vorzugsweise im Bereich von 1 - 4 cm, noch bevorzugter 2 - 3 cm. Die Anordnung des Strahlenübertragungsweges und des Erfassungsweges für den übertragenen Strahl werden wünschenswerterweise so gewählt, daß die hypothetische Linie zwischen diesen Wegen nicht durch das Rotationszentrum des Rotors hindurchgeht und daß der Lichtweg solange wie möglich ist.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann der Abstand zwischen der unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe und der konischen Oberfläche des Rotors je nach Wunsch geregelt werden. Der Spitzenabschnitt der konischen Oberfläche des Rotors wird z.B. aus einem Magnetmaterial aufgebaut, in der Bodenwand der Kammer zur Aufnahme der Probe ist ein Sensor eines Meßgerätes für die Wirbelstromverlagerung vorgesehen, und der Abstand wird durch diesen Sensor festgestellt. Auf dem Spitzenabschnitt der konischen Oberfläche des Rotors kann außerdem ein säulenförmiges Magnetmaterial vorgesehen sein, daß z.B. aus rostfreiem Stahl aufgebaut ist, damit die Messung des Abstandes erleichtert wird.

Wenn mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung die Änderung der Formen der Blutplättchen oder die Änderung der Konzentration der Calciumionen in den Blutplättchen bestimmt wird, wird auf der Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe vorzugsweise ein Streustrahlenübertragungsweg vorgesehen. Die Änderung der Konzentration der Calciumionen in den Blut-

plättchen wird durch die Messung der Fluoreszenz aus der Probe bestimmt, dies wird später beschrieben. Bei der Bestimmung der Änderung der Formen der Blutplättchen wird die auf die Probe angewendete Scherspannung wünschenswerterweise mit nicht mehr als 10 dyne/cm<sup>2</sup> eingestellt, oder der Probe wird ein Inhibitor für die Blutplättchenaggregation zugesetzt, z.B. Prostaglandin.

Bei der erfindungsgemäßen Vorrichtung umfaßt die Antriebseinrichtung zum Drehen des Rotors wünschenswerterweise einen Gleichstrommotor mit einer Codiereinrichtung. Wenn dieser Antriebseinrichtung verwendet wird, kann eine hohe und gleichmäßige Scherspannung von bis zu 200 dyne/cm<sup>2</sup> in ausreichender Weise auf die Probe angewendet werden. Der Betrieb der Antriebseinrichtung wird von einer Steuereinheit geregelt. Wenn im Speicher der Steuereinheit ein Programm gespeichert ist, kann der Rotor nicht nur mit konstanter Drehgeschwindigkeit betrieben werden, sondern auf die Probe der Zellsuspension können auch in einer einzigen Messung verschiedene Scherspannungen in einem großen Bereich von 0 dyne/cm<sup>2</sup> - 200 dyne/cm<sup>2</sup> angewendet werden, und somit kann in einer einzigen Messung die Reaktion der Zellen in der Probe in einem großen Bereich bestimmt werden.

Bei der vorliegenden Erfindung können die Anomalien von Glycoprotein auf der Zellmembran der Blutplättchen und des Plasmaproteins, das sich mit diesem Glycoprotein verbindet, die eng mit den Funktionen der Blutplättchen verbunden sind, leicht festgestellt werden, indem die Aggregation der Blutplättchen im niedrigen Bereich von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup> und im hohen Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> der Scherspannung bestimmt wird. Da die Scherspannung, die einen physiologischen und genauen Stimulus darstellt, auf Zellen angewendet wird, und eine geringe Veränderung der Zellen als Reaktion auf diesen Stimulus mit hoher Empfindlichkeit gemessen werden kann, kann beim erfindungsgemäßen Gerät das fol-

gende Phänomen bezüglich der Wirkungsweise der Blutplättchen gefunden werden.

Obwohl von umfangreichen Forschungen über die Funktion von Blutplättchen berichtet wurde, wurden die meisten Mechanismen dieser Funktionen nicht geklärt. Das Verhältnis zwischen der auf eine Probe der Blutplättchensuspension angewendeten Scherspannung und der Aggregation der Blutplättchen durch diese angewendete Scherspannung wird im Bereich der Scherspannung von 0 - 200 dyne/cm<sup>2</sup> gemessen, wobei die erfindungsgemäße Vorrichtung verwendet wird. Als Ergebnis wird deutlich, daß die Aggregation der Blutplättchen eng mit dem Glycoprotein (hier nachfolgend als "GP" bezeichnet) auf der Zellmembran der Blutplättchen und dem Plasmaprotein in Zusammenhang steht, daß sich mit dem Glycoprotein verbindet, und daß der Mechanismus dieser Aggregation, die im Bereich von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup> verursacht wird, vom Mechanismus der Aggregation verschieden ist, die im Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> verursacht wird. Gegenwärtig sind mehr als 10 Arten von GP bekannt. Es wird berichtet, daß diese GP eng mit den Funktionen der Blutplättchen in Zusammenhang stehen, z.B. der Aggregation und den Hafteigenschaften. Insbesondere wird aufgeführt, daß von diesen GP, GPIIb mit den Hafteigenschaften der Blutplättchen in Zusammenhang steht, und daß der Komplex von GPIIb und GPIIIa (hier nachstehend als "GPIIb/IIIa") bezeichnet, mit den Aggregationseigenschaften der Blutplättchen in Zusammenhang steht. Beim Plasmaprotein steht auf der anderen Seite der von Willebrand-Faktor in einem engen Zusammenhang mit den Hafteigenschaften der Blutplättchen, und Fibrinogen ist eng mit den Aggregationseigenschaften der Blutplättchen verbunden.

Zuerst wurde das Verhältnis zwischen dem Glycoprotein auf der Zellmembran der Blutplättchen und der Aggregation der Blutplättchen aufgrund der angewendeten Scherspannung analysiert. Als Ergebnis wurden folgende Fakten verdeutlicht.



## 15

Wenn die Blutplättchensuspension mit einem monoklonalem Antikörper von GPIb behandelt wird, wird die Aggregation der Blutplättchen im Bereich der Scherspannung von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup> gefördert und sie wird im Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> vollständig unterdrückt, dies wird im später beschriebenen Beispiel 2 gezeigt. Wenn die Blutplättchensuspension mit dem monoklonalem Antikörper von GPIIb/IIIa behandelt wird, wird die Blutplättchenaggregation im Bereich der Scherspannung von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup> vollständig unterdrückt, und sie wird im Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> unvollständig unterdrückt. Eine einem Patienten mit dem Bernard-Soulier-Syndrom entnommene Probe, in der GPIb fehlt, findet normalerweise eine Aggregation der Blutplättchen im Bereich der Scherspannung von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup> statt, im Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> gibt es jedoch überhaupt keine Aggregation der Blutplättchen. In einer einem Patienten mit Thrombasthenie entnommenen Probe, in der GPIIb/IIIa fehlt, fehlt jegliche Aggregation der Blutplättchen im Bereich der Scherspannung von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup>, im Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> gibt es jedoch eine leichte Aggregation der Blutplättchen.

Danach wurde das Verhältnis zwischen dem Plasmaprotein und der Aggregation der Blutplättchen aufgrund der angewendeten Scherspannung analysiert. Wenn eine Blutplättchensuspension mit einem monoklonalen Antikörper behandelt wird, der gegen die Verbindungsabschnitte von GPIIb/IIIa des von Willebrand-Faktors wirkt, wird dadurch die Aggregation der Blutplättchen im Bereich von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup> überhaupt nicht unterdrückt, wird jedoch im Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> vollständig unterdrückt, dies ist detailliert im Beispiel 2 gezeigt. Bei einer einem Patienten entnommenen Probe, der an der von Willebrand-Krankheit leidet, wobei der von Willebrand-Faktor fehlt, gibt es normalerweise eine Aggregation der Blutplättchen im Bereich der Scherspannung von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup>, im Bereich von nicht weniger als 80

## 16

dyne/cm<sup>2</sup> findet jedoch überhaupt keine Aggregation der Blutplättchen statt. In einer Probe, die einem Patienten entnommen wurde, der an Afibrinogenämie leidet, wobei Fibrinogen fehlt, gibt es überhaupt keine Blutplättchenaggregation im Bereich der Scherspannung von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup>, im Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> findet jedoch normalerweise eine Blutplättchenaggregation statt.

Als Ergebnis dieser Untersuchung unter Anwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung wird somit deutlich, daß bei der Blutplättchenaggregation aufgrund der Anwendung der Scherspannung zwei Mechanismen auftreten.

Die Blutplättchenaggregation, die im Bereich der geringen Scherspannung von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup> verursacht wird, steht mit der Kombination von Fibrinogen, das ein Plasmaprotein ist, und GPIIb/GPIIIa in Zusammenhang, der aufgrund ihrer wechselseitigen Wirkung in der Membran der Blutplättchen auftritt. Die Blutplättchenaggregation, die im Bereich einer hohen Scherspannung von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> verursacht wird, steht mit der Kombination der von Willebrand-Faktoren, die ein Plasmaprotein sind, aufgrund von GPIb und GPIIb/IIIa in Zusammenhang. Diese wichtigen Entdeckungen sorgen für ein einfaches und exaktes Verfahren zur Bestimmung der Aggregationseigenschaften und der Hafteigenschaften der Blutplättchen, die zwei wichtige Funktionen der Blutplättchen darstellen. Durch Messung der Blutplättchenaggregation, die durch Anwendung einer Scherspannung auf die Probe hervorgerufen wird, können somit die Aggregationseigenschaften der Blutplättchen im Bereich von 10 - 40 dyne/cm<sup>2</sup>, und die Hafteigenschaften der Blutplättchen im Bereich von nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> bestimmt werden.

Die obengenannte Blutplättchenaggregation kann exakt und kontinuierlich bestimmt werden, wenn die erfindungsgemäße Vorrichtung verwendet wird. Durch die erfindungsgemäße Vor-

## 17

richtung kann auch die genaue Reaktion der Zellen auf die Stimulation bestimmt werden. Die Probe der Zellsuspension (eine Blutplättchensuspension) ist in der Kammer zur Aufnahme der Probe enthalten, der Rotor wird gedreht und auf die Probe, die zwischen der konischen Oberfläche des Rotors und der unteren Innenoberfläche der Kammer zur Aufnahme der Probe angeordnet ist, wird eine Scherspannung angewendet. In die zwischen der konischen Oberfläche und der unteren Innenoberfläche angeordnete Probe wird vom Strahlenübertragungsweg ein Strahl übertragen, dieser übertragene Strahl wird vom Erfassungsweg für den übertragenen Strahl erfaßt, und der übertragene Strahl wird kontinuierlich erfaßt und aufgezeichnet. Die genaue Reaktion der Zellen im Zustand der Laminatströmung auf eine gleichmäßig angewendete Scherspannung, d.h. die Aggregation der Plättchen, wird kontinuierlich bestimmt, indem die Änderung des übertragenen Strahls, d.h. die Änderung des Transmissionsfaktors, gemessen wird.

Die genaue Reaktion der Zellen kann mit hoher Empfindlichkeit bestimmt werden, die etwa das Eintausendfache der einer herkömmlichen Vorrichtung beträgt; besonders Anomalien, die mit Glycoprotein und Plasmaprotein in Zusammenhang stehen, die eng mit den Funktionen der Blutplättchen verbunden sind, können leicht und exakt bestimmt werden. Die erfindungsgemäße Vorrichtung und das erfindungsgemäße Verfahren können folglich zur Diagnose und Behandlungen von Erkrankungen verwendet werden, die eine anomale Funktion der Blutplättchen hervorrufen, und können auch für die Entwicklung von Medikamenten verwendet werden, die der Behandlung von Blutplättchenanomalien dienen.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann außerdem zur Bestimmung der Abweichung der Konzentration der Calciumionen im Cytoplasma der Blutplättchen verwendet werden. Die Konzentration der Calciumionen ist für die Regelung der Funktionen der Blutplättchensuspension wichtig. Ein Pigment, wie Indo-

1AM (Gryniewicz, G., Poenie, M. und Tsien, R.V.: J. Biol. Chem., S. 260, 3440 (1986)), das leicht durch die Zellmembran dringen kann, sich im Cytoplasma ansammelt und durch Verbindung mit dem Calciumion eine Fluoreszenz emittieren kann, wird z.B. der Probe der Blutplättchensuspension zugegeben. Eine Strahlung, die anregendes Licht für das Pigment umfaßt, wird auf die Probe gerichtet, und die Fluoreszenz vom Pigment, die durch das anregende Licht erzeugt wird, wird kontinuierlich erfaßt. Somit kann die Änderung der Konzentration der Calciumionen im Cytoplasma der Blutplättchen kontinuierlich bestimmt werden, indem die Änderung der nachgewiesenen Fluoreszenz gemessen wird.

Die oben genannten und weiteren Aufgaben, Merkmale und Vorteile der vorliegenden Erfindung werden aus der folgenden detaillierten Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen deutlich und leichter erkennbar, wenn diese mit den beigegeführten Zeichnungen in Zusammenhang gebracht wird, welche zeigen:

Fig. 1 eine Perspektivansicht der Vorrichtung zur Bestimmung der Eigenschaften der Zellen nach einer Ausführungsform dieser Erfindung;

Fig. 2 eine vergrößerte senkrechte Teilschnittansicht der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung;

Fig. 3 eine Draufsicht der in Fig. 2 gezeigten Vorrichtung, wobei der Rotor entnommen wurde;

Fig. 4 eine schematische Darstellung der Innenseite der Einheit der Lichtquelle der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung;

Fig. 5 eine schematische Darstellung der Innenseite der Einheit des Photodetektors der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung;

Fig. 6 eine grafische Darstellung der Beträge des Transmissionsfaktors, die im Beispiel 1 mit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung gemessen wurden;

## 19

Fig. 7A und 7B grafische Darstellungen der Werte des Transmissionsfaktors, die im Beispiel 2 mit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung gemessen wurden;

Fig. 8A und 8B grafische Darstellungen, die weitere Werte des Transmissionsfaktors zeigen, die im Beispiel 2 mit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung gemessen wurden;

Fig. 9A und 9B grafische Darstellungen, die weitere Werte des Transmissionsfaktors zeigen, die im Beispiel 2 mit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung gemessen wurden;

Fig. 10A und 10B grafische Darstellungen, die weitere Werte des Transmissionsfaktors zeigen, die im Beispiel 2 mit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung gemessen wurden;

Fig. 11 und 14 grafische Darstellungen, die weitere Werte des Transmissionsfaktors zeigen, die im Beispiel 2 mit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung gemessen wurden;

Fig. 15 eine grafische Darstellung der Messungen des Verhältnisses der Fluoreszenzstärke, die im Beispiel 3 mit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung erhalten wurden;

Fig. 16 eine grafische Darstellung der Messungen des Prozentsatzes der Aggregation der Blutplättchen, der im Beispiel 4 erhalten und nach einem herkömmlichen Berechnungsverfahren gemessen wurde; und

Fig. 17 eine grafische Darstellung der Messungen des Prozentsatzes der Aggregation der Blutplättchen, der im Beispiel 4 erhalten und die nach dem erfindungsgemäßen Berechnungsverfahren gemessen wurde.

Nachfolgend werden einige bevorzugte Ausführungsformen dieser Erfindung anhand der beigefügten Zeichnungen beschrieben.

Die Fig. 1 bis 5 zeigen die Vorrichtung zur Bestimmung der funktionellen Eigenschaften der Zellen nach einer Ausführungsform dieser Erfindung. Diese Vorrichtung ist besonders für die Bestimmung der Eigenschaften der Blutplättchen in einer Probe einer Blutplättchensuspension gestaltet.

Bei dieser Ausführungsform wird die Kammer 101 zur Aufnahme der Probe, die eine Probe der Blutplättchensuspension als Probe der Zellsuspension enthält, zylindrisch von einer zylindrischen Wanne 1 definiert, die eine untere Innenoberfläche 36a und eine seitliche Innenoberfläche 35a aufweist. Die Wanne besteht aus einer lichtdurchlässigen Seitenwand 35 aus einem ausreichend geglätteten transparenten farblosen Acrylharz und einer nicht lichtdurchlässigen Bodenwand 36, die eine mit der Blutplättchensuspension in Kontakt stehende Oberfläche aufweist, die ausreichend geglättet ist und die aus Acrylharz besteht. Auf der Rückseite der Bodenwand 36 ist ein ausgesparter Abschnitt 38 ausgebildet, und in diesem ausgesparten Abschnitt ist ein Sensor 33 des Meßgerätes für die Wirbelstromverlagerung angeordnet.

Ein Rotor 2 mit einer konischen Oberfläche 2a, die in Richtung zur unteren Innenoberfläche 36a eine konvexe Form aufweist, ist in der Kammer 101 zur Aufnahme der Probe angeordnet.

Der Rotor 2 besteht aus einem nicht lichtdurchlässigen Acrylharz und seine konische Oberfläche 2a ist ausreichend geglättet. Die konische Oberfläche 2a steht der unteren Innenoberfläche 36a in einem Winkel von nicht mehr als  $2^\circ$  gegenüber. Ein säulenförmiges Teil 31 aus rostfreiem Stahl ist aus einem Magnetmaterial geformt und ist im Rotor 2 an dessen unterem Spitzenabschnitt vorgesehen, und die konisch geformte Oberfläche dieses Teils ist ausreichend geglättet. Ein Schaftloch 34 ist im oberen Abschnitt des Rotors 2 gebildet, und in dieses Schaftloch ist der Ausgangsschaft 4a des Gleichstrommotors 4 vom kernlosen Typ mit einer Codiereinrichtung eingesetzt. Der Motor 4 ist an einer Befestigungsplatte 41 angebracht, und diese Befestigungsplatte ist an eine höhenverstellbare Stufe bzw. einen höhenverstellbaren Träger 9 angebracht, der auf der Grundplatte 42 befe-

## 21

stigt ist. Dieser höhenverstellbare Träger 9 weist eine Skala 10 zur Grobeinstellung und eine Skala 11 zur Feineinstellung auf. Der Abstand zwischen dem Rotor 2 und der Bodenwand 36 der Wanne 1 wird durch die Skalen 10 und 11 eingestellt. Der Wert dieses Abstandes wird durch den Sensor 33 gemessen. Dieser Sensor 33 erfaßt die Position des säulenförmigen Teils 31 aus rostfreiem Stahl, dieses erfaßte Signal wird der Anzeige 27, die auf der Grundplatte 42 vorgesehen ist, durch die Leitung 39 zugeführt, die mit dem Sensor und der Anzeige verbunden ist, und der Wert des Abstandes oder der Höhe des Rotors wird auf der Anzeige angezeigt. Die untere Oberfläche des säulenförmigen Teils 31 aus rostfreiem Stahl kann eine teilweise oder vollständig ebene Oberfläche sein, damit die Erfassung der Position des Teils durch den Sensor 33 erleichtert wird. Der Motor 4 wird nach einem Programm betrieben, das im Speicher in der Steuereinheit 5 für den Antrieb des Motors gespeichert ist.

Die Wanne 1 wird im ausgesparten Abschnitt der Halterung 3 gehalten, die aus rostfreiem Stahl besteht, und die Wanne wird durch einen Fixierstift 30 befestigt, der auf dem oberen Abschnitt der Halterung vorgesehen ist. Ein Strahlenübertragungsweg 28 wird durch die Seitenwand der Halterung in der Halterung 3 in einer Position gebildet, die etwas über der inneren Unterseite des ausgesparten Abschnitts der Halterung liegt. Der Erfassungsweg für den übertragenen Strahl 29 wird in der Halterung 3 durch die Seitenwand der Halterung in einer Position gebildet, die zur Position des Strahlenübertragungsweges 28 entgegengesetzt ist. Der Weg zwischen dem Strahlenübertragungsweg 28 und dem Erfassungsweg für den übertragenen Strahl 29 ist vom Rotationszentrum des Rotors 2 entfernt angeordnet. Ein Streustrahlenübertragungsweg 40 ist in der Seitenwand der Halterung 3 zwischen dem Strahlenübertragungsweg 28 und dem Erfassungsweg für den übertragenen Strahl 29 vorgesehen. Dieser Streustrahlenübertragungsweg 40 ist als Schlitz ausgebildet, der sich in der

## 22

Umfangsrichtung um die Seitenwand der Halterung 3 herum erstreckt. Für den Strahlenübertragungsweg 28 ist eine optische Faser 14 vorgesehen und für den Erfassungsweg für den übertragenen Strahl 29 eine optische Faser 15. Jede optische Faser ist eine optische Faser vom einkernigen Typ, deren Kern aus Quarzglas besteht, und mit dem ein Stecker eines Anschlusses vom Ferritkerntyp bzw. Ferrittyp (FC type connector) verbunden ist. Die optischen Fasern 14 und 15 sind durch Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp (nicht gezeigt), die mit den Halterung verbunden sind, mit den Halterungen 32 bzw. 26 verbunden. In den Streustrahlenübertragungsweg 40 ist eine optische Faser 16 zur Übertragung der Streustrahlen eingesetzt. Der Kern dieser optischen Faser 16 besteht ebenfalls aus Quarzglas, und mit dieser optischen Faser ist ein Stecker des Anschlusses vom Ferrittyp verbunden. Die optische Faser 16 ist durch einen Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp (nicht gezeigt) an das Führungsteil 25 angebracht, und das Führungsteil wird vom Ständer 24 gehalten, der auf der Grundplatte 42 befestigt ist.

Die Halterung 3 ist auf einer Unterlage 43 befestigt, und diese Unterlage ist auf dem Drehtisch 12 befestigt, der einen oberen Tisch 12a und einen unteren Tisch 12b umfaßt, der sich drehen und die Umfangsrichtung des oberen Tisches einstellen kann, wenn die am unteren Tisch angebrachte Justierskala 13 gedreht wird. Durch diese Justierung wird die Position der Halterung 3 in der Umfangsrichtung eingestellt, und die Position der optischen Faser 16 im Streustrahlenübertragungsweg 40 wird in Umfangsrichtung innerhalb der Verlängerung des Weges im Schlitz in Umfangsrichtung eingestellt. Der Winkel für die Übertragung der Streustrahlung in Umfangsrichtung kann somit geeignet eingestellt werden.

Die mehrkernige optische Faser 44, die an einem Endabschnitt einen Stecker vom Anschluß vom Ferrittyp aufweist, der in einer einzigen Klemme mit 12 optischen Quarzfasern gefüllt



## 23

ist, ist mit der Halterung 32 verbunden, an die ein Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp zur Befestigung der optischen Fasern angebracht ist. Die mehrkernige optische Faser 44 wird in zwei mehrkernige optische Fasern 18 bzw. 19 geteilt, die sechs Fasern aufweisen. Ein Endabschnitt jeder dieser mehrkernigen optischen Fasern 18 und 19 ist ebenfalls in einer einzigen Klemme enthalten und ist mit dem Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp verbunden, der durch den Stecker des Anschlusses vom Ferrittyp mit der Einheit der Lichtquelle 6 verbunden ist.

Eine He-Ne-Gaslaserquelle 51 und eine Quelle 52 für anregendes Licht einer Quecksilber-Xenon-Lampe sind in der Einheit der Lichtquelle 6 angeordnet. Diese He-Ne-Gaslaserquelle 51 wird verwendet, um die Blutplättchenaggregation zu bestimmen. Diese Laserquelle erzeugt einen Gaslaserstrahl, dessen Wellenlänge 632,8 nm beträgt, und hat eine Leistungsabgabe der Endfläche von 1,6 mW, wenn eine optische Quarzfaser damit verbunden ist, die einen Kern mit einem Durchmesser von 125  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 2 m aufweist. Die Quelle 52 des anregenden Lichtes wird für die Bestimmung der Änderung der Konzentration der Calciumionen im Cytoplasma der Blutplättchen verwendet, sie hat eine Leistungsabgabe von 100 W und einen für UV-Licht durchlässigen Filter 53, der als Interferenzfilter daran angebracht ist.

Ein Ende der optischen Faser 20, das an beiden Enden Stecker des Anschlusses vom Ferrittyp aufweist, ist mit der Halterung 26 verbunden, mit der der Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp verbunden ist, damit die optische Faser 15 fixiert wird. Der Stecker am anderen Ende der optischen Faser 20 ist mit dem Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp verbunden, der auf der Photodetektoreinheit 7 vorgesehen ist. Eine mehrkernige optische Faser 23, deren Endabschnitt einen Stecker des Anschlusses vom Ferrittyp aufweist, der in einer einzigen Klemme mit 12 optischen Quarzfasern gefüllt ist, ist

## 24

über den Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp, der an das Führungsteil angebracht ist, mit der optischen Faser 16 verbunden, die durch das Führungsteil 25 und den Ständer 25 fixiert ist. Die mehrkernige optische Faser 23 wird in zwei mehrkernige optische Fasern 21 bzw. 22 unterteilt, die sechs Fasern aufweisen. Ein Endabschnitt jeder dieser mehrkernigen optischen Fasern 21 und 22 ist ebenfalls in einer einzigen Klemme enthalten und ist mit dem Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp verbunden, der durch den Stecker des Anschlusses vom Ferrittyp an die Photodetektoreinheit 7 angebracht ist.

Eine Photodiode 61, zwei Photoelektronenvervielfacherröhren 62a und 62b und ein elektronischer Schaltkreis 63 für den Empfang der Signale von diesen Elementen und für die Analyse dieser Werte, sind in der Photodetektoreinheit 7 gruppiert. Ein Interferenzfilter 64, dessen Schwerpunktwellenlänge 633 nm beträgt, ist an den Adapter des Anschlusses vom Ferrittyp angebracht, mit dem der optische Filter 20 verbunden ist, und dieser Filter ist mit der Photodiode 61 verbunden. Ein Interferenzfilter 65a, dessen Schwerpunktwellenlänge 410 nm beträgt, ist in der Vorderseite der Photoelektronenvervielfacherröhre 62a vorgesehen, und ein Interferenzfilter 65b, dessen Schwerpunktwellenlänge 480 nm beträgt, ist in der Vorderseite der Photoelektronenvervielfacherröhre 62b vorgesehen. Diese Photoelektronenvervielfacher 62a und 62b sind durch diese Interferenzfilter 65a bzw. 65b mit den Adaptern des Anschlusses vom Ferrittyp verbunden, mit denen die optischen Fasern 21 bzw. 22 verbunden sind.

Ein Rekorder 8 für den Empfang der von der Photodetektoreinheit 7 abgegebenen Signale ist mit der Photodetektoreinheit verbunden, und dieser Rekorder zeichnet mit zwei Schreibern die Werte der Änderung der Trübung der Blutplättchensuspension aufgrund der Blutplättchenaggregation und die Werte der Änderung der Konzentration der Calciumionen in den Blutplättchen kontinuierlich auf.

Bei dieser Ausführungsform weist die Halterung 3 im mittleren Abschnitt der Bodenwand ein Loch 37 auf, da der Sensor 33 in der Wanne 1 eingebaut ist. Die Halterung 3 kann dieses Loch jedoch nicht aufweisen. Die Kammer zur Aufnahme der Probe kann auch ohne zylindrische Wanne definiert werden, d.h. durch die Halterung selbst.

Nachfolgend wird die Messung zur mengenmäßigen Erfassung der Blutplättchenaggregation erläutert, die durch die Anwendung der Scherspannung hervorgerufen wird. Dabei muß ein bestimmter Index in Betracht gezogen werden, indem die erhaltene Kurve der Aggregation der Blutplättchen verallgemeinert wird, damit der Zustand der Blutplättchenaggregation mengenmäßig eingeschätzt werden kann. Bei der ersten vorstehend erläuterten herkömmlichen Vorrichtung, die in großem Umfang für klinische Untersuchungen angewendet wird, wird das Aggregationsverhältnis (ARc) der Blutplättchen wie folgt definiert.

$$\text{ARc (\%)} = (\text{It} - \text{Iprp}) / (\text{Ippp} - \text{Iprp}) \times 100 \quad (1)$$

In dieser Gleichung ist "It" die Menge der übertragenen Strahlen, wenn sich die Blutplättchen zusammenballen, Ippp ist die Menge der übertragenen Strahlen des blutplättchenarmen Plasmas (hier nachfolgend als "PPP" bezeichnet), und Iprp ist die Menge der hindurchgegangenen Strahlen des blutplättchenreichen Plasmas (hier nachfolgend als "PRP" bezeichnet) vor der Aggregation der Blutplättchen. Dieser Index schwankt stark mit dem Lichtweg in den Zellen, der Trübung des Plasmas und der Anzahl der Blutplättchen vor der Aggregation. Da er der Änderung der Anzahl der nicht verklumpten Blutplättchen nicht proportional ist, ist er außerdem nicht zur Bestimmung der Blutplättchenaggregation geeignet. Diese Probleme werden durch die erfindungsgemäße Vorrichtung gelöst, da diese Vorrichtung die Blutplättchenaggregation mit hoher Empfindlichkeit erfassen kann und so

26

mit der Unterschied zwischen der Menge der hindurchgegangenen Strahlen des "PPP" und der Menge der hindurchgegangenen Strahlen des "PRP" sehr groß wird.

Bei der vorliegenden Erfindung hat sich gezeigt, daß das Verhältnis zwischen der Anzahl der Blutplättchen und der Menge der übertragenen Strahlen das Gesetz von Lambert Beer erfüllt, und daß die Änderung der Menge der übertragenen Strahlen primär durch die Änderung der Anzahl der nicht zusammengeballten Blutplättchen verursacht wird. Somit wird die folgende Gleichung in Betracht gezogen und als der Index definiert, der das exakte Verhältnis der Aggregation der Blutplättchen (ARi) zeigen kann.

$$ARi (\%) = \frac{\log (I_t/I_{PRP})}{\log (I_{PPP}/I_{PRP})} \times 100 \quad (2)$$

Mit dem oben genannten Index wird es möglich, das Verhältnis der Aggregation der Blutplättchen als Änderung der Anzahl der nicht zusammengeballten Blutplättchen aufzuzeigen und die Aggregation der Blutplättchen unabhängig vom Lichtweg in den Zellen, der Trübung des Plasmas und der Anzahl der Blutplättchen vor der Aggregation mengenmäßig zu bestimmen.

#### Beispiel 1

Mit der in Fig. 1 gezeigten Vorrichtung, die folgende Abmessungen aufweist, wurden Messungen durchgeführt.

Der Radius des Rotors 2 beträgt 1,5 cm, der Radius des säulenförmigen Teils 31 aus rostfreiem Stahl beträgt 2,5 mm, und der Winkel zwischen der konischen Oberfläche 2a des Rotors und der Ebene, die zur Rotationsachse des Rotors senkrecht ist, beträgt 1,0°. Der Innendurchmesser der Wanne 1 beträgt 3,1 cm, der Außendurchmesser der Wanne 3,4 cm, und die Tiefe der Wanne, in die Blutplättchensuspension einge-

27

führt wird, beträgt 1,3 cm. Die Dicke der Bodenwand 36 der Wanne 1 beträgt 2 mm, und die Dicke des unteren Abschnittes an der Stelle des Lochs 38 beträgt 0,5 mm. Der Innendurchmesser der Halterung 3 beträgt 3,41 cm, und der Außendurchmesser der Halterung 5,5 cm. Der Strahlenübertragungsweg 28 und der Erfassungsweg für den übertragenen Strahl 29 sind so angeordnet, daß der Abstand zwischen dem linearen Weg, der die Zentren der Wege 28 und 29 verbindet, und der Mitte des zylindrischen ausgesparten Abschnittes der Halterung 3 0,8 cm betragen kann. Der Schlitz des Streustrahlenübertragungsweges 40 ist so geformt, daß der Winkel zwischen den Linien  $120^\circ$  betragen kann, die die Mitte des ausgesparten Abschnittes der Halterung 3 und die Endoberflächen des Schlitzes in Umfangsrichtung der Halterung verbinden. Der Kerndurchmesser der optischen Fasern 14, 15, 16 und 20 beträgt 1 mm, und der Durchmesser ihrer Verkleidung 1,035 mm. Der Kerndurchmesser der optischen Fasern 18, 19, 21, 22, 23 und 44 beträgt 0,200 mm, und der Durchmesser deren Verkleidung 0,230 mm. Die Höhe des höhenverstellbaren Trägers 9 beträgt 15,5 cm und der Durchmesser des Drehtisches 12 beträgt 9 cm. Die Länge der Grundplatte 42 beträgt 20 cm und ihre Breite 25 cm.

Nachfolgend werden der Betrieb der Vorrichtung und die Durchführung des Verfahrens zur Bestimmung der Funktion des Blutplättchenaggregates in der Blutplättchensuspension erläutert.

Mit einer silikonisierten Nadel mit dem Eichmaß 20 wird aus der Ellenbogenvene eines gesunden Erwachsenen Blut entnommen und in einen Kunststoffbehälter gegeben, dies erfolgt bei einem Verhältnis der 3,8%igen wässrigen Natriumcitratlösung/Blut von 1/9. Dieses Blut wird 15 Minuten lang mit einer Zentrifuge mit einer Zentrifugenleistung von 100 G getrennt, wodurch "PRP" erhalten wird, und die restliche rote Zellsuspension wird anschließend mit einer Zentrifuge 10 Minuten lang bei einer Zentrifugenleistung von 1500 G ge-

28

trennt, wodurch "PPP" erhalten wird. "PRP", dessen Zahl der Blutplättchen angemessen geregelt ist, wird unter Verwendung der erhaltenen "PRP" und "PPP" hergestellt. Dieses "PRP" mit der geregelten Blutplättchenzahl ist mit 0,3 ml im Abschnitt in der Nähe der Bodenwand 36 der Wanne 1 enthalten, der Rotor 2 wird über der Bodenwand nach unten bewegt, wenn die Skala 10 zur Grobeinstellung und die Skala 11 zur Feineinstellung des höhenverstellbaren Trägers 9 gedreht werden, und der Abstand zwischen dem säulenförmigen Teil 31 aus rostfreiem Stahl und der Mitte der Bodenwand 36 wird auf 40  $\mu\text{m}$  eingestellt, dies erfolgt durch die Erfassung des Abstandes mit dem Sensor 33 und durch die Anzeige dieses Abstandes auf dem Display 27. Dann wird der Rotor 2 gedreht, auf das enthaltene "PRP" wird 5 Minuten lang eine Scherspannung im Bereich von 0 bis 200  $\text{dyne/cm}^2$  angewendet, eine Strahlung mit der Wellenlänge von 633 nm wird kontinuierlich aus der optischen Faser 14 in die Probe geleitet, und die durch die Probe übertragenen Strahlen werden von der optischen Faser 15 empfangen und durch die Photodetektoreinheit 7 erfaßt. Wenn sich die Blutplättchen zusammenballen, nimmt der Betrag des Transmissionsfaktors zu, dessen Veränderung wird vom Rekorder 8 aufgezeichnet.

Fig. 6 zeigt die Kurven der Blutplättchenaggregation von 5 gesunden Erwachsenen, wenn Scherspannungen von 18, 36, 72 und 108  $\text{dyne/cm}^2$  angewendet werden. Aus Fig. 5 wird deutlich, daß die Blutplättchenaggregation bei Scherspannungen von 18 und 108  $\text{dyne/cm}^2$  im Vergleich mit Scherspannungen von 36 und 72  $\text{dyne/cm}^2$  im allgemeinen gefördert wird.

## Beispiel 2

Es wurde die gleiche Vorrichtung wie in Beispiel 1 verwendet. Die Blutplättchenaggregation bei Scherspannungen von 18 und 108  $\text{dyne/cm}^2$  wurde in ähnlicher Weise wie in Beispiel 1 bei folgenden Proben gemessen.

Die Fig. 7A und 7B zeigen das Ergebnis der Probe Nr. 1 einer normalen Blutplättchensuspension. Die Fig. 8A und 8B zeigen das Ergebnis der Probe Nr. 2 der Blutplättchensuspension, deren Glycoprotein GPIb, das in einem engen Zusammenhang mit den Hafteigenschaften der Blutplättchen steht, die die Zellmembran der Blutplättchen zeigen, mit einem monoklonalem Antikörper behandelt wurde. Die Fig. 9A und 9B zeigen das Ergebnis der Probe Nr. 3 einer Blutplättchensuspension, deren GPIIb/IIIa, das in einem engen Zusammenhang mit den Aggregationseigenschaften der Blutplättchen steht, die die Zellmembran der Blutplättchen zeigen, mit dem monoklonalem Antikörper behandelt wurde. Die Fig. 10A und 10B zeigen das Ergebnis der Probe Nr. 4 einer Blutplättchensuspension, deren von Willebrand-Faktor, der mit den Hafteigenschaften der Blutplättchen in Zusammenhang steht, mit dem monoklonalem Antikörper behandelt wurde. Fig. 11 zeigt das Ergebnis der Probe Nr. 5 der Blutplättchensuspension, die einem Patienten entnommen wurde, der am Bernard-Soulier-Syndrom leidet, wobei GPIb fehlt. Fig. 12 zeigt das Ergebnis der Probe Nr. 6 der Blutplättchensuspension, die einem Patienten entnommen wurde, der an Thrombasthenie leidet, wobei GPIIb/IIIa fehlt. Fig. 13 zeigt das Ergebnis der Probe Nr. 7 einer Blutplättchensuspension, die einem Patienten entnommen wurde, der an der von Willebrand-Krankheit leidet, wobei der von Willebrand-Faktor fehlt. Fig. 14 zeigt das Ergebnis der Probe Nr. 8 einer Blutplättchensuspension, die einem Patienten entnommen wurde, der an Afibrinogenämie leidet, wobei Fibrinogen fehlt.

Bei der Probe Nr. 2, die in den Fig. 8A und 8B gezeigt ist, wird im Vergleich mit der Probe Nr. 1, die in den Fig. 7A und 7B gezeigt ist, die Blutplättchenaggregation bei der geringen Scherspannung von 18 dyne/cm<sup>2</sup> gefördert und bei der hohen Scherspannung von 108 dyne/cm<sup>2</sup> vollständig unterdrückt. Bei der Probe Nr. 3, die in den Fig. 9A und 9B ge-

zeigt ist, wird die Blutplättchenaggregation bei der geringen Scherspannung von 18 dyne/cm<sup>2</sup> vollständig unterdrückt; sie zeigt sich bei der hohen Scherspannung von 108 dyne/cm<sup>2</sup> leicht. Bei der Probe Nr. 4, die in den Fig. 10A und 10B gezeigt ist, wird die Blutplättchenaggregation bei der geringen Scherspannung von 18 dyne/cm<sup>2</sup> nicht unterdrückt, wird jedoch bei der hohen Scherspannung von 108 dyne/cm<sup>2</sup> nahezu vollständig unterdrückt. Bei der Probe Nr. 5, die in Fig. 11 gezeigt ist, gibt es eine normale Aggregation der Blutplättchen bei der geringen Scherspannung von 18 dyne/cm<sup>2</sup>, bei der hohen Scherspannung von 108 dyne/cm<sup>2</sup> gibt es jedoch überhaupt keine Aggregation der Blutplättchen. Bei der Probe Nr. 6, die in Fig. 12 gezeigt ist, gibt es bei der geringen Scherspannung von 18 dyne/cm<sup>2</sup> überhaupt keine Blutplättchenaggregation, bei der hohen Scherspannung von 108 dyne/cm<sup>2</sup> besteht jedoch eine geringe Aggregation der Blutplättchen. Bei der Probe Nr. 7, die in Fig. 13 gezeigt ist, gibt es bei der geringen Scherspannung von 18 dyne/cm<sup>2</sup> eine normale Aggregation der Blutplättchen, bei der hohen Scherspannung von 108 dyne/cm<sup>2</sup> gibt es jedoch überhaupt keine Aggregation der Blutplättchen. Bei der Probe Nr. 8, die in Fig. 14 gezeigt ist, gibt es bei der geringen Scherspannung von 18 dyne/cm<sup>2</sup> überhaupt keine Blutplättchenaggregation, bei der hohen Scherspannung von 108 dyne/cm<sup>2</sup> besteht jedoch eine normale Aggregation der Blutplättchen.

Wie es aus den vorstehenden Ergebnissen deutlich wird, wird die von GPIb, GPIIb/IIIa, Fibrinogen und vom von Willebrand-Faktor hervorgerufene Anomalie, die eng mit den Funktionen und Eigenschaften der Blutplättchen in Zusammenhang steht, einfach untersucht, indem die Aggregation der Blutplättchen im Bereich geringer und hoher Scherspannung überprüft wird.



### Beispiel 3

Bei der Vorrichtung vom Beispiel 1 wird mit den Photoelektronenvervielfachern 62a und 62b ein Gerätesystem verbunden, das eine Photozähleinrichtung, eine Universalanschlußkanalschnittstelle (GP-IB interface) und einen Mikrocomputer umfaßt. Es wird die Änderung der Konzentration der Calciumionen in den Blutplättchen bestimmt.

Zuerst wird wie folgt eine Pufferlösung der Calciumionenlösung hergestellt. Eine Lösung, die 60 mM Ethylenglycolbis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat (nachfolgend als "EGTA" bezeichnet) und 12 mM 3-Morpholinopropansulfonsäure (nachfolgend als "MOPS" bezeichnet) umfaßt, wird einer Lösung zugegeben, die 120 mM Kaliumchlorid (hier nachfolgend als "KCl" bezeichnet), 12 mM MOPS und 12 mM Calciumchlorid (hier nachfolgend als  $\text{CaCl}_2$  bezeichnet) umfaßt. Da bestätigt wurde, daß das Calciumion durch die Calciumionenelektrode nicht erfaßt wurde, wurde eine Lösung mit einem geregelten pH-Wert von 7,20 hergestellt, die 100 mM KCl, 10 mM MOPS und 10 mM des Calciumsalzes von EGTA (hier nachfolgend " $\text{K}_2\text{Ca EGTA}$ " bezeichnet) umfaßt. Eine Lösung, die 60 mM EGTA und 12 mM MOPS umfaßt, wird mit 1/5 des Volumens einer Lösung, die 120 mM KCl und 12 mM MOPS umfaßt, und einer Lösung mit einem geregelten pH-Wert von 7,20 zugegeben, die 100 mM KCl, 10 mM MOPS und 10 mM des Kaliumsalzes von EGTA (hier nachfolgend als " $\text{K}_2\text{H}_2 \text{EGTA}$ " bezeichnet) umfaßt. Mit diesen beiden Lösungsarten wurden Pufferlösungen des Calciumions hergestellt, die die Konzentrationen 0 mM,  $37,3 \times 10^{-6}$  mM (37,3 nM),  $100 \times 10^{-6}$  mM (100 nM),  $226 \times 10^{-6}$  mM (226 nM),  $604 \times 10^{-6}$  mM (604 nM) und 1 mM aufwiesen.

Danach wird eine wässrige Lösung von Indo-1, das ein Pigment ist, das bei der Verbindung mit dem Calciumion eine bestimmte Fluoreszenz emittiert, den oben genannten Pufferlösungen in Mengen bezüglich der Calciumionenkonzentrationen

von 6/1000 des Volumens zugesetzt. Auf diese Weise werden die Proben hergestellt.

Jede Probe mit 0,3 ml ist in der Wanne 1 enthalten, und der Rotor 2 wird auf ähnliche Weise wie im Beispiel 1 nach unten bewegt. Der Rotor 2 wird gedreht und durch die optische Faser 14 wird eine UV-Strahlung in die Probe geleitet. Indo-1 emittiert bei der Bestrahlung mit UV-Strahlen zwei Fluoreszenzarten mit unterschiedlichen Wellenlängen, d.h. eine Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 410 nm, die von dem mit dem Calciumionen verbundenen Indo-1 abgegeben wird, und eine Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 480 nm, die von Indo-1 allein abgegeben wird. Diese Fluoreszenzemissionen werden mit dem oben genannten Gerätesystem gemessen. Für das Verhältnis zwischen der Konzentration der Calciumionen und der Stärke der oben genannten Fluoreszenzemissionen nennt das oben genannte Dokument von Grynkiewicz et al. die folgende Gleichung:

$$Ca^{2+} = K_d \left( \frac{S_{Indo-1}^{480}}{S_{Indo-1Ca}^{480}} \right) (R - R_{min}) / (R_{max} - R)$$

In dieser Gleichung ist  $Ca^{2+}$  die Konzentration des Calciumions.  $K_d$  ist die Calciumionen-Dissoziationskonstante des Indo-1, das mit dem Calciumion verbunden ist.  $S_{Indo-1}^{480}$  ist die Stärke der Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 480 nm, wenn die Calciumionenkonzentration 0 beträgt.  $S_{Indo-1Ca}^{480}$  ist die Stärke der Fluoreszenz mit der Wellenlänge 480 nm, wenn das gesamte Indo-1 mit den Calciumionen verbunden ist, wenn die Calciumionenkonzentration auf einen übermäßig hohen Wert erhöht wird (dies entspricht einer Pufferlösung, deren Calciumionenkonzentration 1 mM beträgt).  $R_{min}$  ist das Verhältnis der Stärke der Fluoreszenz der Fluoreszenzemissionen mit Wellenlängen von 410 und 480 nm, wenn die Calciumionenkonzentration 0 beträgt.  $R_{max}$  ist das Verhältnis der Stärke der Fluoreszenz der Fluoreszenzemissionen mit Wellenlängen von

## 33

410 und 480 nm, wenn die Calciumionenkonzentration auf einen zu hohen Wert eingestellt wurde. R ist das Verhältnis der Stärke der Fluoreszenz der Fluoreszenzemissionen mit Wellenlängen von 410 und 480 nm, wenn die Fluoreszenz jeder Calciumionen-Pufferlösung bestimmt wird. In die oben genannte Gleichung wird das Verhältnis der Stärke der Fluoreszenz R jeder Probe eingesetzt,  $K_d$  wird bestimmt und die Eichkurve wird gezogen.

Danach wird eine Probe der Blutplättchensuspension wie folgt hergestellt.

Zuerst wird "PRP" hergestellt, indem in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 einem gesunden Erwachsenen Blut entnommen wird. Diesem "PRP" wird saure Citratdextrose bis zu einer Endkonzentration von 20% zugesetzt, es wird 7 Minuten lang mit einer Zentrifuge mit einer Zentrifugenleistung von 800 G getrennt, wodurch die Sedimentation der Blutplättchen bewirkt wird. Nach der Entfernung des Überstandes wird die Pufferlösung HEPES-Tyrode zugesetzt, die 4 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethanschwefelsäure, 137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 3,3 mM Natriumphosphat, 1 mM Magnesiumchlorid, 5,6 mM Glucose und 0,35 mg/ml Rinderserumalbumin umfaßt, so daß die Anzahl der Blutplättchen auf  $10 \times 10^4/\mu\text{l}$  eingestellt wird. Dieser Blutplättchensuspension wird außerdem eine Dimethylsulfoxidlösung von 1 mM Indo-1AM zugegeben, die durch die Acetoxymethylveresterung der Carboxylgruppe des oben beschriebenen Indo-1 eine Permeabilität durch die Zellmembran zeigt, so daß die Endkonzentration des Indo-1AM auf 5  $\mu\text{M}$  eingestellt wird. Die entstandene Suspension wird 30 Minuten lang bei 37°C stehengelassen. Saure Citratdextrose wird der Blutplättchensuspension zugegeben, so daß die Endkonzentration auf 20% eingestellt wird, und diese Suspension wird 7 Minuten lang mit einer Zentrifuge mit einer Zentrifugenleistung von 800 G getrennt, wodurch eine erneute Sedimentation der Blutplättchen bewirkt wird. Nach der Ent-

## 34

fernung des Überstandes wird die Pufferlösung HEPES-Tyrode zugesetzt, so daß die Anzahl der Blutplättchen auf  $10 \times 10^4/\mu\text{l}$  eingestellt wird. Somit wird eine Probe zur Bestimmung der Calciumionenkonzentration der Blutplättchen hergestellt.

Der Probe werden Fibrinogen und der von Willebrand-Faktor zugesetzt, so daß deren Endkonzentration auf  $20 \mu\text{g/ml}$  eingestellt wird. Die Probe mit  $0,3 \text{ ml}$  wird in die Wanne 1 gegeben, und die Stärke der Fluoreszenz wird nach einem Verfahren bestimmt, das dem vorstehenden zur Herstellung der oben genannten Eichkurve ähnlich ist. Fig. 15 zeigt die Änderung des Verhältnisses der Stärke der Fluoreszenz  $R$  der Fluoreszenzemissionen mit Wellenlängen von  $410$  und  $480 \text{ nm}$  bei Bedingungen der Scherspannung von  $18$  und  $108 \text{ dyne/cm}^2$ . Wie es aus Fig. 15 ersichtlich ist, ändert sich die Calciumionenkonzentration in den Blutplättchen im unteren Bereich der Scherspannung nicht, sie steigt jedoch im hohen Bereich dieser Scherspannung.

**Beispiel 4**

Bei der Vorrichtung von Beispiel 1 wird mit der Photodiode 61 ein Gerätesystem verbunden, das ein Meßgerät für die Lichtleistung, eine Universalanschlußkanal-Schnittstelle und einen Mikrocomputer umfaßt. Die Blutplättchenaggregation wird mit dem in der Gleichung (2) gezeigten neuen Index bestimmt und ausgedrückt.

Zuerst wird in die Halsschlagader eines Hasen mit einem Gewicht von etwa  $3 \text{ kg}$  ein Schlauch eingesetzt, der aus Vinylchlorid besteht und einen Außendurchmesser von  $1,35 \text{ mm}$  hat. Das Blut wird dem Hasen in einem Verhältnis von  $3,8\%$  wässriger Natriumcitratlösung/Blut in einen Kunststoffbehälter entnommen, das  $1/9$  entspricht. Dann werden in der gleichen Weise wie in Beispiel 1 "PPP" und "PRP" hergestellt, und die

## 35

Blutplättchensuspensionen für die Probe A, in der die Anzahl der Blutplättchen  $42 \times 10^4/\mu\text{l}$  beträgt, die Probe B, in der die Anzahl der Blutplättchen  $21 \times 10^4/\mu\text{l}$  beträgt, und die Probe C, in der die Anzahl der Blutplättchen  $14 \times 10^4/\mu\text{l}$  beträgt, werden durch Verdünnung des "PRP" mit dem "PPP" hergestellt. Zuerst wird auf diese Proben 15 Minuten lang eine Scherspannung von  $3 \text{ dyne/cm}^2$  angewendet, so daß keine Aggregation der Blutplättchen verursacht wird, und es wird der Transmissionsfaktor durch das "PRP" vor der Blutplättchenaggregation bestimmt. Dann wird die Scherspannung 15 Minuten lang auf  $18 \text{ dyne/cm}^2$  erhöht, und es wird der Wert der Blutplättchenaggregation erhalten. Der Transmissionsfaktor wird bestimmt, die Kurve der Blutplättchenaggregation, die durch den Prozentsatz der Aggregation dargestellt wird, wird mit dem Mikrocomputer berechnet, und es wird auch der maximale Prozentsatz der Aggregation berechnet. Fig. 16 zeigt die Kurven nach dem herkömmlichen Berechnungsverfahren, d.h. die, die aus der oben genannten Gleichung (1) erhalten wurden. Fig. 17 zeigt die Kurven nach dem neuen erfindungsgemäßen Verfahren, d.h. die von der Gleichung (2) erhaltenen.

Die entsprechenden Blutplättchen wurden außerdem sofort nach der oben genannten Bestimmung mit Formalin fixiert, die Anzahl der nicht zusammengeballten Blutplättchen wird mit der automatischen Zähleinrichtung für die Blutplättchen gezählt, und der Änderungsbetrag der Zahl der Blutplättchen zwischen der Zahl vor und nach der Aggregation wird berechnet. Der berechnete Wert der Probe A beträgt danach 65%, der der Probe B 76% und der der Probe C 80%. Diese Werte stimmen ausreichend mit den Prozentsätzen der Aggregation der entsprechenden Proben überein, die von den in Fig. 17 gezeigten Kurven erhalten werden.

Beim herkömmlichen Bestimmungsverfahren, das in Fig. 16 gezeigt ist, sind die aus den Aggregationskurven erhaltenen Prozentsätze der Aggregation am Ende der Messung anderer-

## 36

seits deutlich geringer als die Werte, die durch die automatische Zähleinrichtung für die Blutplättchen erhalten werden. Wenn der Prozentsatz der Aggregation durch das herkömmliche Verfahren dargestellt wird, kann außerdem die irrtümliche Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Aggregation der Blutplättchen umso wirksamer gefördert wird, je geringer die Anzahl der vor der Aggregation vorhandenen Blutplättchen ist.

Wie es vorstehend beschrieben wurde, kann der aus der Gleichung (2) berechnete Aggregationswert die Aggregation der Blutplättchen exakt und mengenmäßig angeben.

37

EP 89 106 075.8

### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Bestimmung der Aggregationseigenschaften von Blutplättchen in einer Probe einer Blutplättchensuspension und der Freisetzung von Substanzen aus diesen Blutplättchen unter einer Scherspannung, wobei diese Vorrichtung umfaßt:

- eine Kammer (101) für die Probe, die von der unteren Innenoberfläche (36a) und der seitlichen Innenoberfläche (35a) zylindrisch definiert wird,
- einen Rotor (2), der in Richtung zur unteren Innenoberfläche (36a) eine konische Oberfläche (2a) mit konvexer Form hat,
- ein photometrisches System, das eine Lichtquelleneinheit (6) und eine Photodetektoreinheit (7) umfaßt,
- eine Antriebseinrichtung (4) zur Rotation des Rotors (2),
- eine Regeleinheit (5) zur Steuerung der Antriebseinrichtung (4), und
- einen Rekorder (8) zur Aufzeichnung des von der Photodetektoreinheit (7) empfangenen Signals

dadurch gekennzeichnet, daß

- a) auf der seitlichen Innenoberfläche (35a) der Kammer (101) für die Probe ein Lichtstrahlenübertragungsweg (28) vorgesehen ist, der wirksam mit der Lichtquelleneinheit (6) verbunden ist, damit durch die zwischen der unteren Innenoberflä-

38

che (36a) und der konischen Oberfläche (2a) des Rotors (2) angeordnete Probe Licht übertragen wird,

b) auf der seitlichen Innenoberfläche (35a) entgegengesetzt zum Lichtstrahlenübertragungsweg (28) ein Erfassungsweg (29) vorgesehen ist, der wirksam mit der Photodetektoreinheit (7) verbunden ist, wobei der Lichtweg durch die Probe zwischen dem Lichtübertragungsweg (28) und dem Lichterfassungsweg (29) nicht kürzer als 1 cm bis kürzer als 4 cm ist,

c) der Rotor (2) einen Radius von nicht mehr als 3 cm hat,

d) der Abstand zwischen der seitlichen Außenoberfläche des Rotors (2) und der Innenoberfläche der Kammer (101) für die Probe im Bereich von 0,2 bis 2,00 mm liegt, und

e) die konische Oberfläche (2a) des Rotors (2) in einem Winkel von nicht mehr als  $2^\circ$  zur unteren Innenoberfläche (36a) zeigt.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, die außerdem einen Streustrahlenübertragungsweg (40) umfaßt, der auf der seitlichen Innenoberfläche (35a) der Kammer (101) zur Aufnahme der Probe vorgesehen ist.

3. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Kammer (101) für die Probe von einer zylindrischen Wanne (1) definiert wird, die aus einer lichtdurchlässigen Seitenwand (35) und einer Bodenwand (36) besteht.

4. Vorrichtung nach Anspruch 3, wobei die Bodenwand (36) nicht lichtdurchlässig ist.

5. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Abstand zwischen der unteren Innenoberfläche (36a) und der konischen Oberfläche (2a) des Rotors (2) regelbar ist.



6. Vorrichtung nach Anspruch 5, wobei zumindest der Spitzenabschnitt der konischen Oberfläche (2a) des Rotors (2) aus einem Magnetmaterial besteht, ein Sensor (33) eines Meßgerätes für die Wirbelstromverlagerung in der Bodenwand (36) der Kammer (101) zur Aufnahme der Probe vorgesehen ist, und dieser Abstand von diesem Sensor (33) erfaßt wird.
7. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Winkel zwischen der konischen Oberfläche (2a) und der unteren Innenoberfläche (36a) im Bereich von 0,3 bis 1,5° liegt.
8. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Strahl durch eine optische Faser (14) in den Strahlenübertragungsweg (28) eingeleitet wird.
9. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der übertragene Strahl durch eine optische Faser (15) vom Erfassungsweg für die übertragenen Strahlen (29) empfangen wird.
10. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Antriebseinrichtung (4) einen Gleichstrommotor mit einer Codiereinrichtung umfaßt.
11. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Regeleinheit (5) programmiert ist, damit die Rotationsgeschwindigkeit der Antriebseinrichtung (4) geändert wird.
12. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei an die Lichtquelleneinheit (6) ein Interferenzfilter (53) angebracht ist.

## 40

13. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Lichtquelleneinheit (6) eine Lichtquelle (51) umfaßt, die monochromatisches Licht emittiert.
14. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Photodetektoreinheit (7) ein photoelektromotorisches Element (61) aufweist, das die photoelektromotorische Kraft ausnutzt.
15. Vorrichtung nach Anspruch 14, wobei dieses photoelektromotorische Element eine Photodiode (61) ist.
16. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei diese Photodetektoreinheit (7) eine Photoelektronenvervielfacherröhre (62a, 62b) aufweist.
17. Vorrichtung nach Anspruch 2, wobei der Streustrahlenübertragungsweg (40) als Schlitz gebildet wird, der sich auf der seitlichen Innenoberfläche (35a) der Kammer (101) für die Probe in Umfangsrichtung um die seitliche Innenoberfläche (35a) erstreckt.
18. Vorrichtung nach Anspruch 17, wobei im Streustrahlenübertragungsweg (40) eine optische Faser (16) vorgesehen ist, die die von der Probe emittierten Streustrahlen empfängt und überträgt.
19. Vorrichtung nach Anspruch 18, wobei die Anordnung der optischen Faser (16) im Streustrahlenübertragungsweg (40) regelbar ist, wenn die Kammer (101) für die Probe in Umfangsrichtung bezüglich der seitlichen Innenoberfläche (35a) gedreht wird.
20. Verfahren zur Bestimmung der Aggregationseigenschaften von Blutplättchen in einer Probe einer Blutplättchensuspension durch Anwendung einer Scherspannung auf die Probe in

41

einer Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche und durch Messung der Änderung des übertragenen Lichtes.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei diese Scherspannung im Bereich von 10 bis 40 dyne/cm<sup>2</sup> angewendet wird.

22. Verfahren nach Anspruch 20, wobei die Scherspannung sowohl im Bereich von 10 bis 40 dyne/cm<sup>2</sup> und nicht weniger als 80 dyne/cm<sup>2</sup> angewendet wird, und die Aggregationseigenschaften und die Hafteigenschaften der Blutplättchen durch Messung der Änderung des Transmissionsfaktors bestimmt werden.

23. Verfahren nach Anspruch 20, welches außerdem die Schritte umfaßt:

Zusatz eines Pigmentes zu der Probe, das bei der Verbindung mit Calciumionen im Cytoplasma der in der Blutplättchensuspension enthaltenen Blutplättchen eine Fluoreszenz emittiert;

Leiten eines Strahls in die Probe, wobei dieser Strahl eine Anregungswellenlänge für das Pigment enthält;

Erfassen der vom Pigment emittierten Fluoreszenz, die durch die Anregungswellenlänge erzeugt wird; und

Bestimmung der Änderung der Konzentration der Calciumionen durch Messung der Änderung der erfaßten Fluoreszenz.



43

FIG. 2

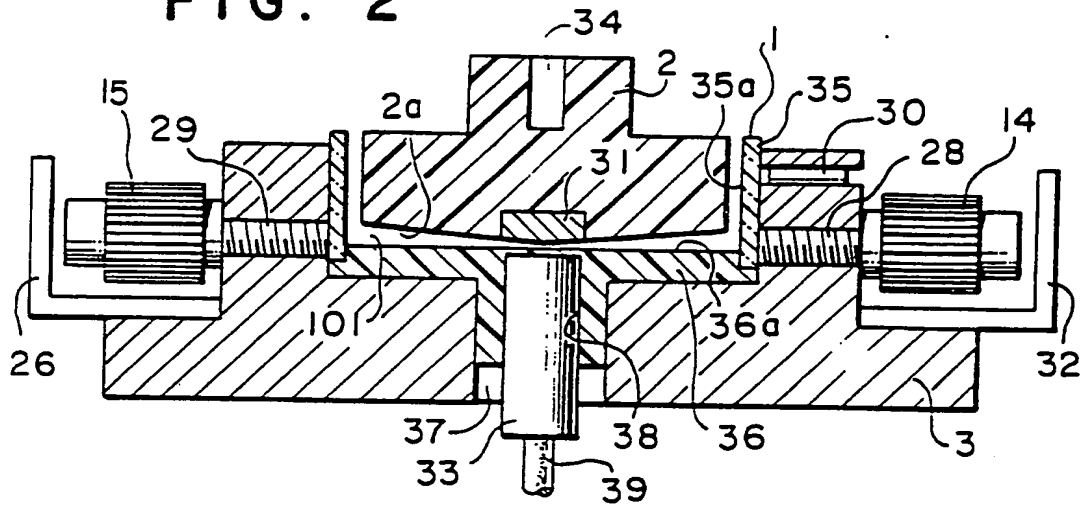
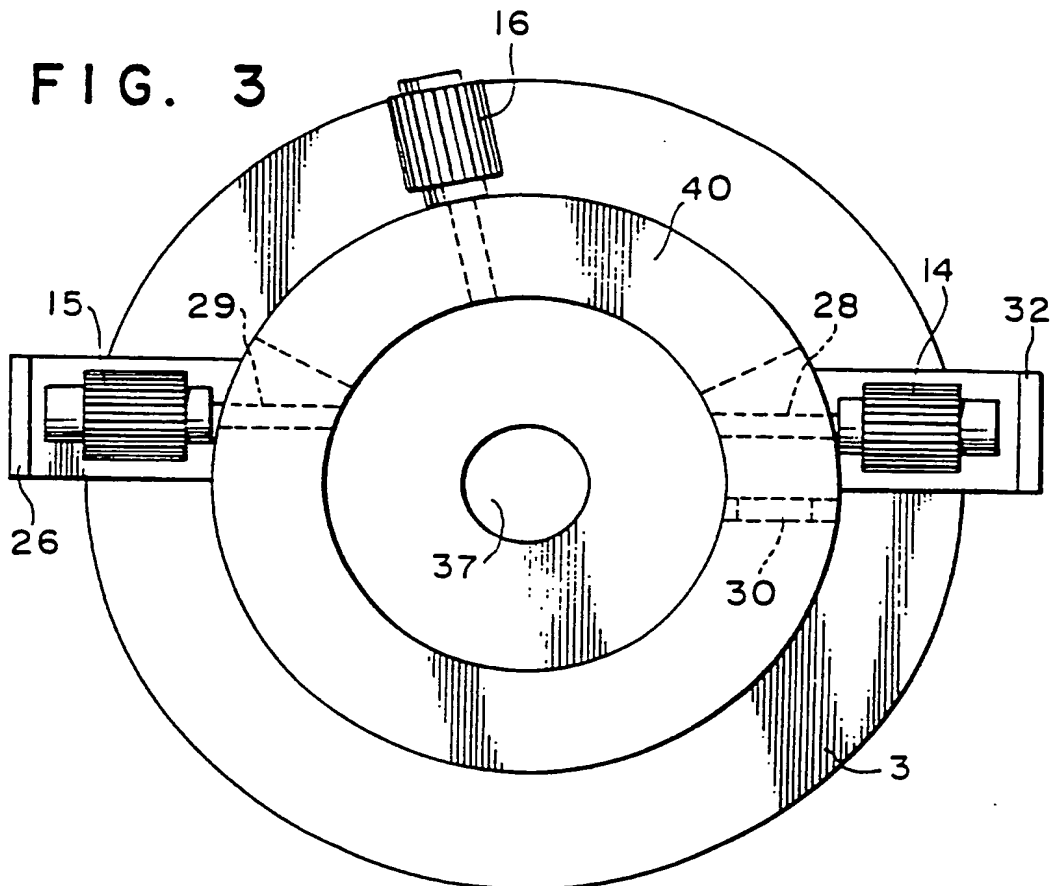


FIG. 3



44

FIG. 4

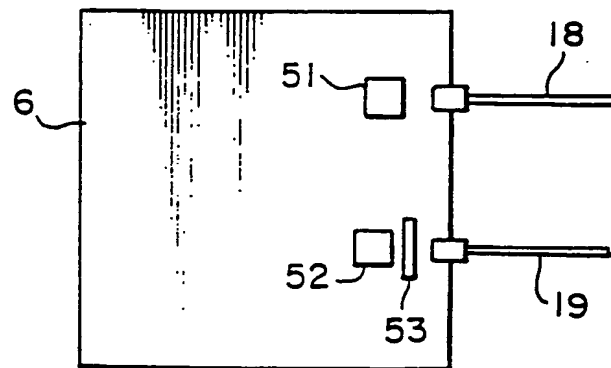
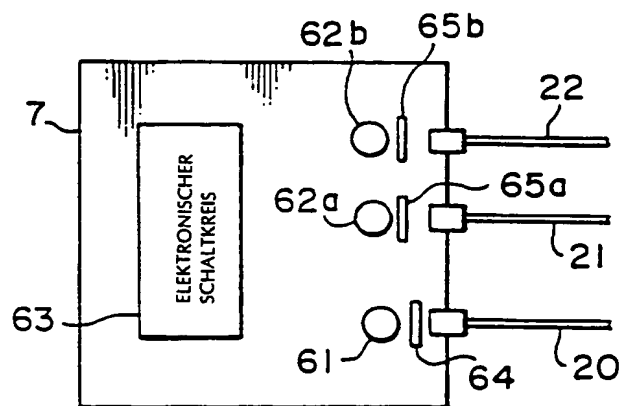
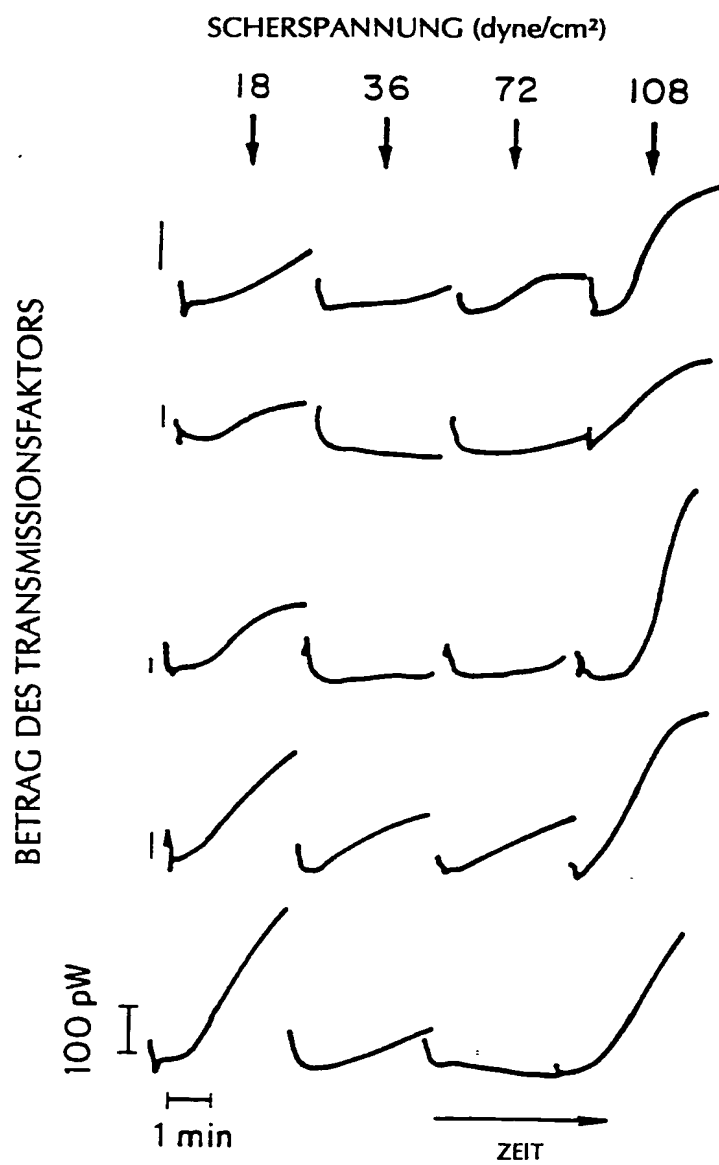


FIG. 5



45

FIG. 6



46

FIG. 7A

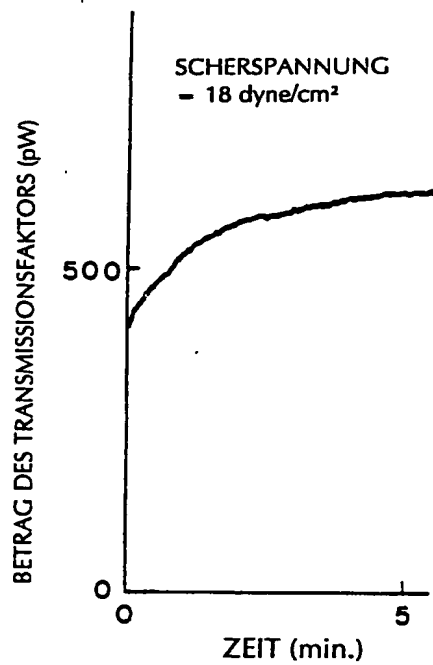


FIG. 7B

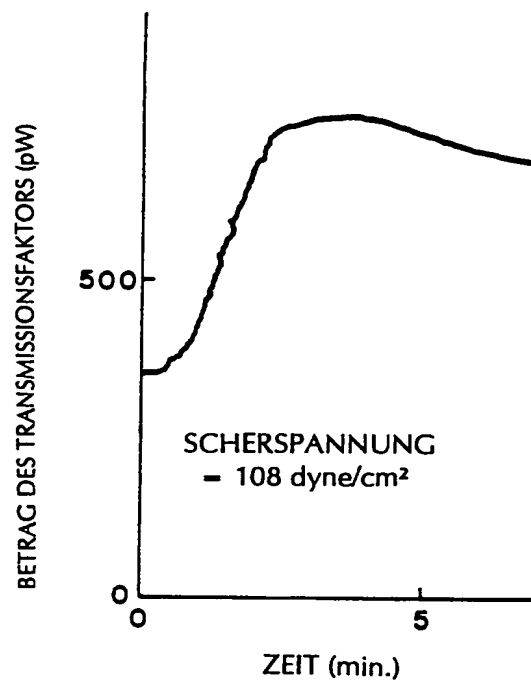


FIG. 8A

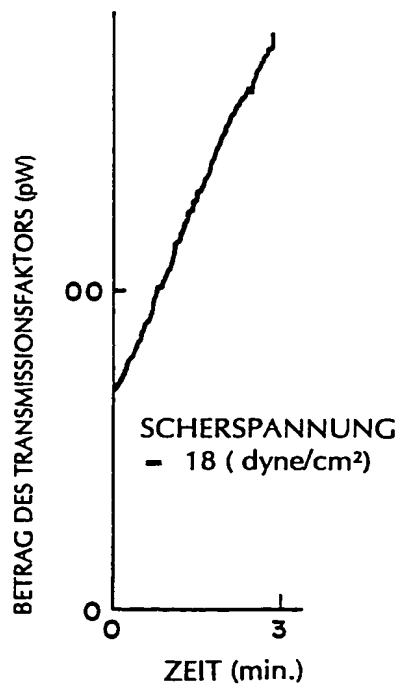
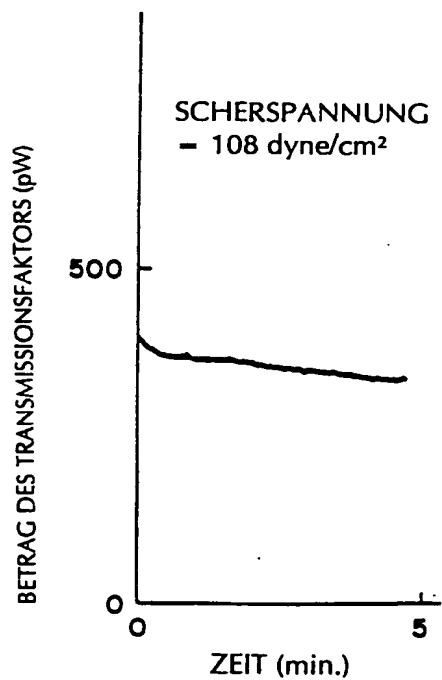


FIG. 8B





47

FIG. 9A

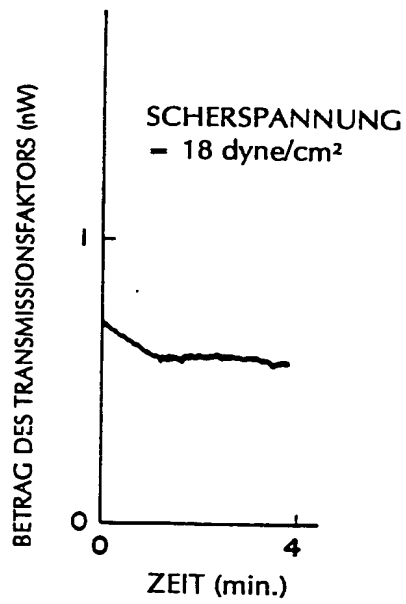


FIG. 9B

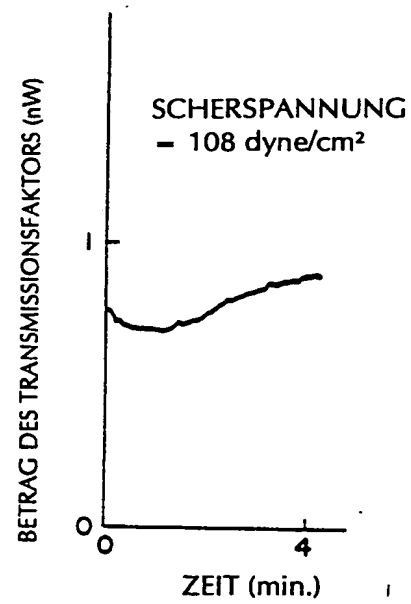
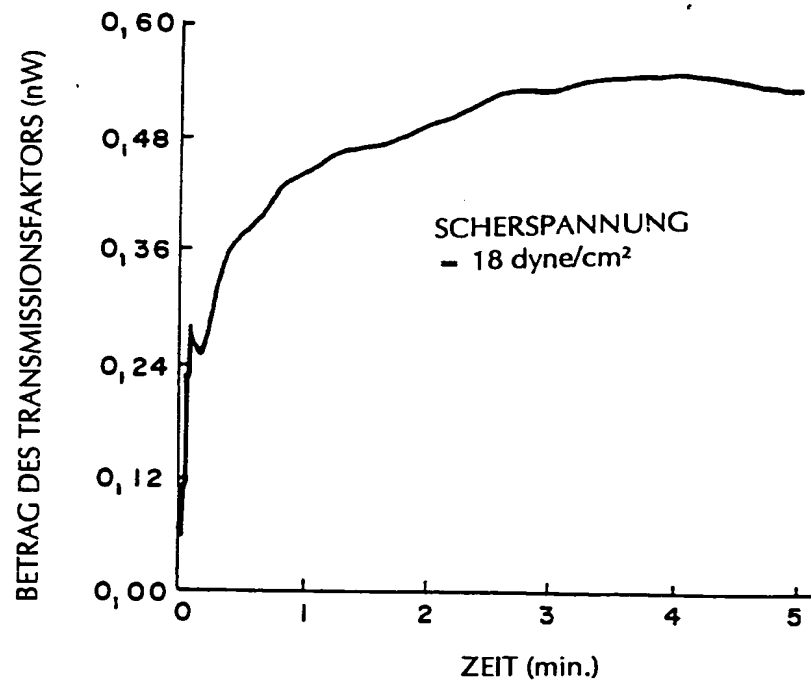


FIG. 10A



48

FIG. 10B

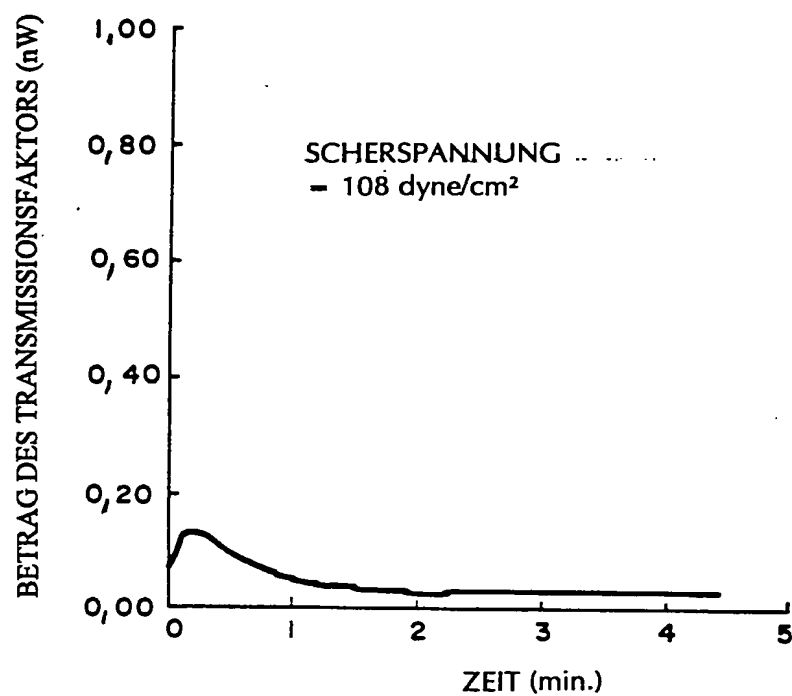
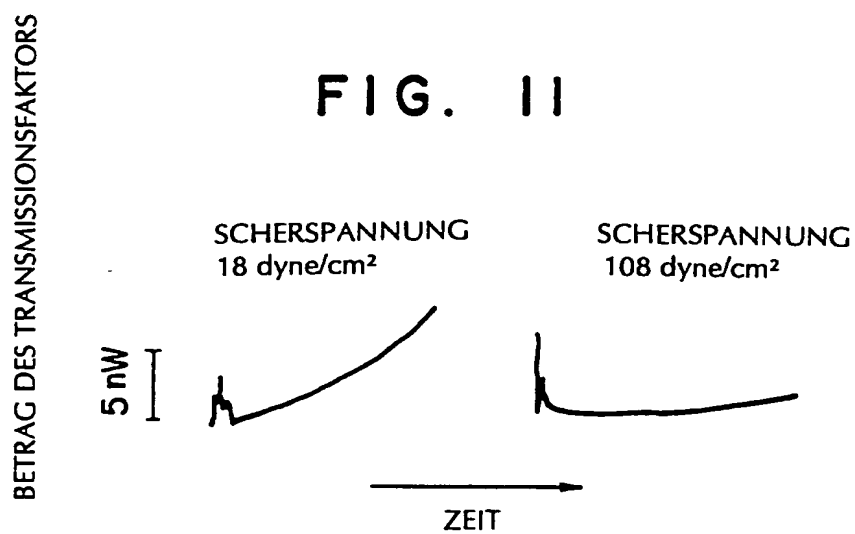


FIG. II



49

FIG. 12

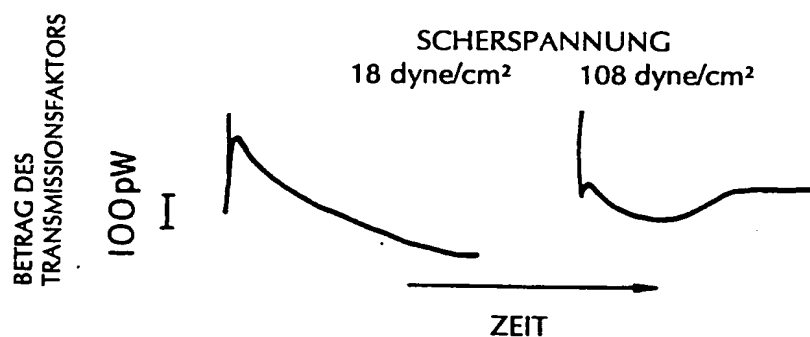


FIG. 13

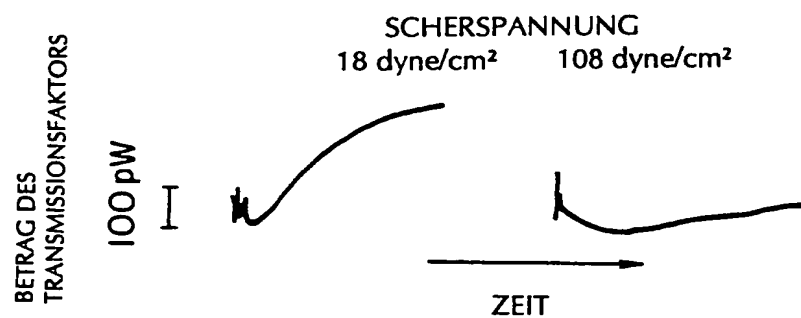
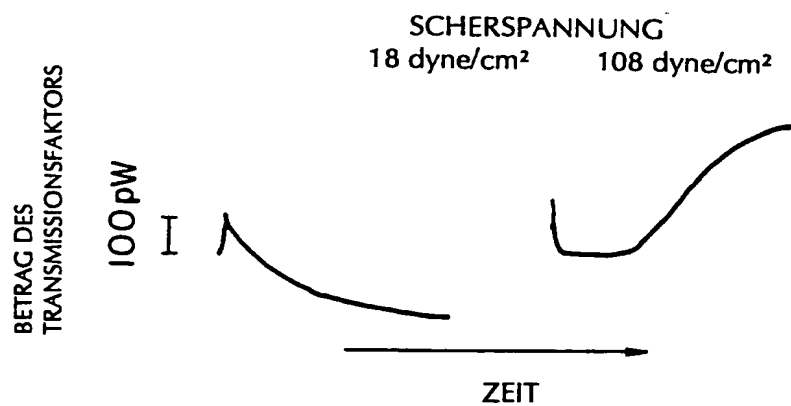
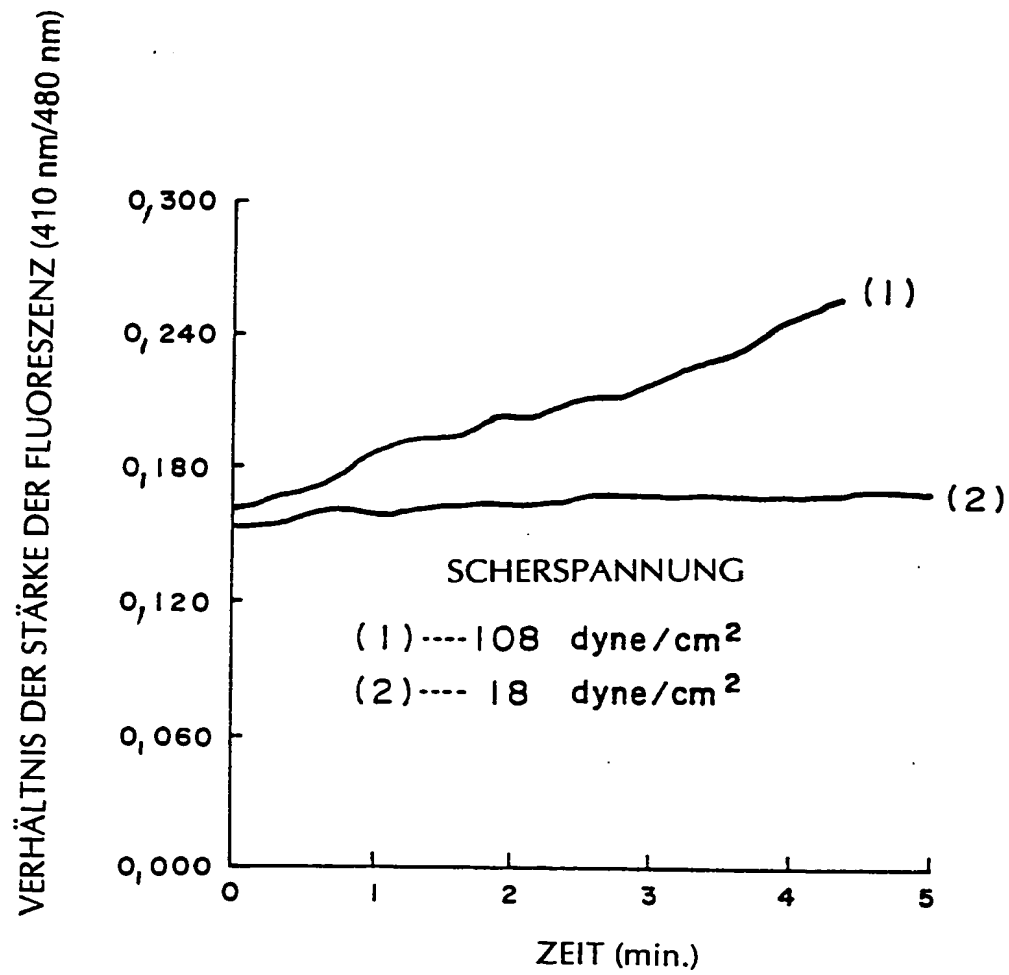


FIG. 14



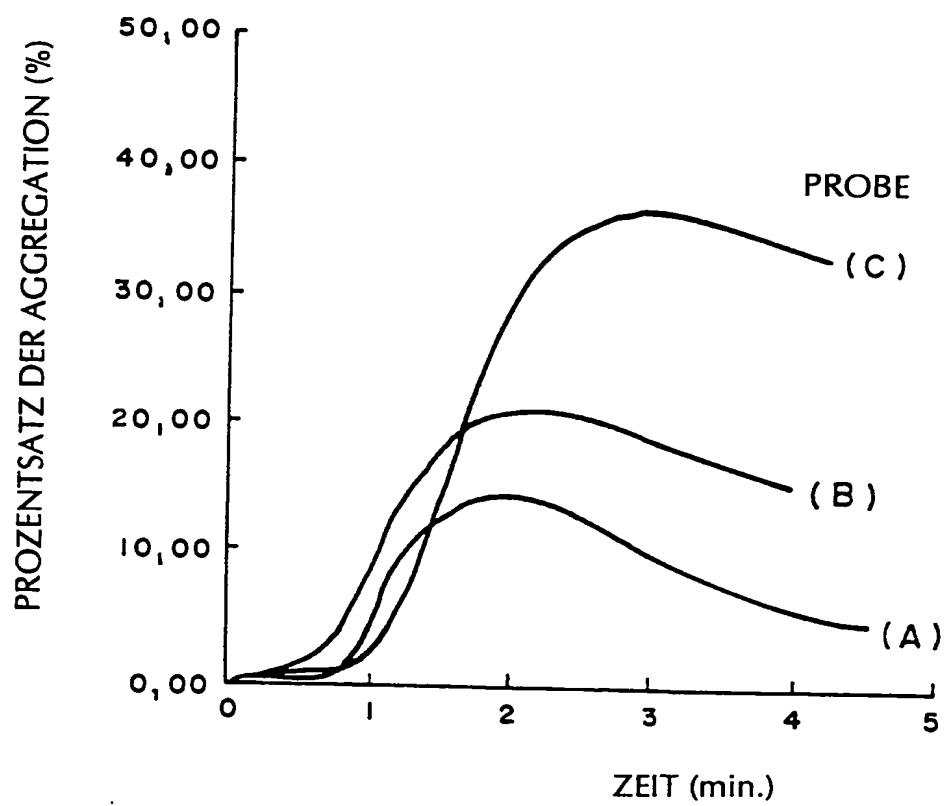
50

FIG. 15



51

FIG. 16



52

FIG. 17

